

**Transiente Tachypnoe des Neugeborenen:  
sind Polymorphismen des Surfactantprotein B auslösend?**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Erol Tutdibi  
aus Kempten

Gießen 2005

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin  
Abt. Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie  
Leiter: Prof. Dr. Reiter  
Universitätsklinikum Giessen

Gutachter: Prof. Dr. L. Gortner

Gutachter: PD Dr. R. Schermuly

Tag der Disputation: 11. November 2005

Meiner Familie gewidmet

### ***Erklärung zur Verfassung der Dissertation***

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	7
1.1	Transiente Tachypnoe des Neugeborenen	7
1.2	Differentialdiagnose des akuten Lungenversagens beim reifen Neugeborenen (neonatales ARDS)	9
1.3	Surfactant	10
1.3.1	Funktion	10
1.3.2	Zusammensetzung	12
1.3.3	Metabolismus	12
1.3.4	Surfactant-assoziierte Proteine (SP)	14
	SP-A	15
	SP-B	16
	SP-C	23
	SP-D	25
1.4	SP-B Polymorphismen	27
1.5	Fragestellung und Zielsetzung	29
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	30
2.1	Patientenkollektiv	30
2.2	Untersuchungsmethoden	32
2.2.1	Isolierung von DNA	32
2.2.2	Polymerasekettenreaktion	32
2.2.3	PCR-Produkte	34
2.2.4	Gelelektrophorese	35
2.2.5	Detektion der 121ins2-Mutation (DNA-Restriktion)	36
2.2.6	Fragmentlängenanalyse	37
2.2.7	DNA-Klonierung	40
2.2.8	DNA-Sequenzierung	41
2.3	Labortechnische Geräte, Chemikalien, Puffer und Lösungen	43
2.4	Statistische Auswertung	46

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	47
3.1	Klinische Daten der Neugeborenen	47
3.2	Analyse der Intron 4-Sequenzen des SP-B Gens	49
3.3	121ins2-Mutation	50
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	51
4.1	Allgemeiner Teil	51
4.1.1	Resorption der fetalen Lungenflüssigkeit	51
4.1.2	Rolle des SP-B im Rahmen der postnatalen pulmonalen Adaptation	56
4.2	Spezieller Teil	59
4.2.1	Methodik	59
4.2.2	Bewertung der Ergebnisse	61
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	67
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	70
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	81
7.1	Häufig verwendete Abkürzungen	81
7.2	Danksagung	82
7.3	Lebenslauf	83
7.4	Datenerhebungsbogen	84

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Transiente Tachypnoe des Neugeborenen

### Definition und Klinik

Die transiente Tachypnoe des Neugeborenen (*transient tachypnea of the newborn*, TTN) ist eine passagere postnatale pulmonale Adaptationsstörung reifer Neugeborener als Folge einer verzögerten Resorption der fetalen Lungenflüssigkeit. Beschrieben wurde sie erstmals 1966 von Avery et al. [Avery et al., 1966]. Andere gebräuchliche Bezeichnungen für die TTN sind *wet lung disease* und *typ II respiratory distress*. Die TTN wird nach charakteristischen klinischen und radiologischen Zeichen diagnostiziert [Wesenberg et al., 1971; Morrison et al., 1995]. Das männliche Geschlecht ist häufiger betroffen. Betroffene Kinder zeigen eine innerhalb der ersten Lebensstunden einsetzende respiratorische Insuffizienz mit Tachypnoe über 60 Atemzügen pro Minute, Stöhnen, Nasenflügeln und Einziehungen, zum Teil mit zusätzlichem Sauerstoffbedarf über Raumluft. Diese klinischen Zeichen sind aus pathophysiologischer Betrachtung aktive Kompensationsmechanismen bei verminderter Lungencompliance und gesteigerter Kollapstendenz der Alveolen. Der benigne und selbstlimitierende Verlauf der Anpassungsstörung mit abnehmendem Sauerstoffbedarf und klinischer Besserung innerhalb zwei bis fünf Tage ist typisch für die TTN [Miller et al., 1980]. Zur Diagnosesicherung ist auf jeden Fall eine Röntgen-Aufnahme des Thorax am ersten Lebenstag notwendig. Radiologische Charakteristika der TTN sind hierbei eine reduzierte Transparenz mit vermehrt perihilär ausstrahlender interstitieller Lungenzeichnung, kleinere Pleuraergüsse und Flüssigkeit im Interlobärsplatt.

### Ätiologie und Risikofaktoren

Die transitorische Tachypnoe wird bei rund 1 bis 2 % aller reifer Neugeborener beobachtet [Dani et al., 1999; Bonafe and Rubaltelli, 1996]. Bis heute ist die Ätiologie und Pathogenese der TTN nicht geklärt. In der Literatur konkurrieren verschiedene Erklärungsmodelle für die TTN. Die meisten Autoren favorisieren die verzögerte Resorption der fetalen Lungenflüssigkeit als möglichen ätiologischen Faktor [Avery et al., 1966; Miller et al., 1980; Taylor, 1971]. Störungen im alveolo-interstitiellen

Natrium-Transport über epitheliale Natriumkanäle (*epithelial sodium channel*, EnaC) und folglich die unzureichende passive Wasserresorption sind bei der TTN und dem Atemnotsyndrom des Frühgeborenen (*respiratory distress syndrome*, RDS) ursächlich postuliert worden [O'Broovich, 1996; Hummler and Horisberger, 1999; Pitkanen, 2001]. Eine alternative pathophysiologische Erklärung ist eine asphyxiebedingte Linksherzinsuffizienz mit dem Ergebnis des pulmonalen interstitiellen Ödems [Stastny and Kind, 1998; Halliday et al., 1981]. Für einige Autoren gilt ein transients Surfactantmangel bzw. – dysfunktion als zentraler Auslöser der TTN [Skelton and Jeffery, 1994; Gross et al., 1983; Hallman et al., 1977]. In anderen Veröffentlichungen wird postuliert, dass im pathophysiologischen Mechanismus der TTN möglicherweise eine milde Unreife der Lunge eine zentrale Bedeutung trägt [Spillman et al., 1988; Gross et al., 1983; James et al., 1984]. Klinische Studien über akute respiratorische Störungen beim Neugeborenen zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen TTN und männlichem Geschlecht, Gestationsalter und der Geburt per Sectio caesarea [Rubaltelli et al., 1998a]. Mütterliche Erkrankungen wie Diabetes [Miller et al., 1980; Hanson and Persson, 1993] und Asthma [Demissie et al., 1998; Rubaltelli et al., 1998b] erhöhen zusätzlich das Risiko für die Entwicklung einer TTN.

### Therapie und Prognose

Die Therapie der TTN ist symptomatisch und liegt besonders im Aufrechterhalten einer ausreichenden Oxygenierung durch zusätzliche Sauerstoffzufuhr. In einzelnen Fällen je nach Ausprägung der Dyspnoe und Ateminsuffizienz bedarf es auch einer Atemhilfe mittels CPAP (*continuous positive airway pressure*, d.h. Aufbau eines kontinuierlichen positiven Drucks in den Atemwegen über eine Maske oder nasalen Rachtentubus) zur Wiedereröffnung kollabierter Alveolen oder auch einer Intubation zur maschinellen Beatmung insbesondere bei Neugeborenen mit schwerer TTN. Nach erfolgter routinemäßiger Abnahme von Kulturen (Blut, Trachealsekret, Urin) und Abstrichen zur Isolierung eines Keims als mögliche Infektionsursache der Atemstörung wird prophylaktisch in der Mehrzahl der Patienten eine antibiotische Behandlung begonnen, welche jedoch nach Ausschluss der Infektion bei unauffälliger Klinik und Laborwerten in der Regel nach wenigen Tagen wieder beendet wird. Therapieversuche mit Furosemid zur Reduzierung des Sauerstoffbedarfs und Besserung der Symptome zeigten in der



bislang einzigen prospektiven kontrollierten Studie mit 50 TTN-Neugeborenen keinen signifikanten Effekt [Wiswell et al., 1985]. Die Erkrankung ist wie bereits erwähnt von vorübergehender Natur. Unter der obigen Therapie zeigt der klinische Zustand des Kindes eine rasche Besserung. In seltenen Fällen kann die TTN jedoch durch eine persistierende pulmonale Hypertension und Pneumothorax kompliziert werden [Bucciarelli et al., 1976; Halliday et al., 1981].

## 1.2 Differentialdiagnose des akuten Lungenversagens beim reifen Neugeborenen (neonatales ARDS)

Atemstörungen machen den nennenswerten Anteil der Morbidität und Mortalität reifer Neugeborenen aus. Die Gesamtinzidenz respiratorischer Morbidität beim reifen Neugeborenen (Gestationsalter  $\geq 37$  Wochen) liegt zwischen 2 und 3 % [Rubaltelli et al., 1998a]. Die klare Abgrenzung der verschiedenen Krankheitsbilder des akuten Atemnotsyndroms ist aus klinischer und therapeutischer Sicht wichtig, wobei wesentliche diagnostische Kriterien bei der Unterscheidung dem Pädriater zur Verfügung stehen (siehe **Tabellen 1** und **2**). Insbesondere bei Atemstörungen ohne rasche Besserungstendenz müssen kardiale und infektiöse Ursachen mit entsprechenden Untersuchungen ausgeschlossen werden.

strukturell normale Lunge	strukturell anomale Lunge	extrapulmonale Erkrankungen
Transitorische Tachypnoe (TTN)	Lungenhypoplasie (Zwerchfellhernie)	Sepsis
Respiratory distress syndrome (RDS)	alveo-kapilläre Dysplasie	angeborene Herzfehler
Mekoniumaspirationssyndrom (MAS)	kongenital-lobäres Emphysem	Choanalatresie, Trachea-/Bronchusstenosen
kongenitale / neonatale Pneumonie	Lungensequester / Lungenzysten	Zentralnervöse und neuromuskuläre Erkrankungen
kongenitale Alveolarproteinose (CAP)	angeborener Chylothorax	Mediastinaltumoren
	kongenitale pulmonale Lymphangiektasie	

**Tabelle 1:** Differentialdiagnose der Atemnotsyndrome beim reifen Neugeborenen; modifiziert nach [Möller, 2002]

Bei reifen Neugeborenen mit Atemstörung wird am häufigsten eine TTN mit 41 % diagnostiziert, gefolgt von kongenitaler Pneumonie bzw. Infektion, Mekoniumaspirationssyndrom, RDS und Asphyxie [Tudehope and Smyth, 1979].

Diagnose	Anamnese	Röntgenbild des Thorax	Sauerstoffbedarf - initial - im Verlauf	Sonstige Kriterien
<b>TTN</b>	Sectio/rasche Spontangeburt	diffuse streifige Verschattung	- moderat - <u>abnehmend</u>	deutliche klinische Besserung innerhalb 6-24h
<b>RDS</b>	elektive terminnahe Sectio bei fehlender Wehentätigkeit	retikulo-granuläres bis weiße Lunge, mit oder ohne Bronchogramm	- moderat - ansteigend	oft leichte Unreife des NG
<b>MAS</b>	mekoniumhaltiges Fruchtwasser, Übertragung, Asphyxie	bilaterale fleckige Infiltrate, Atelektasen, Areale mit Überblähung	- persistierend - ansteigend	Nachweis von Mekonium subglottisch
<b>Pneumonie</b>	vorzeitiger Blasensprung > 24h, Fieber der Mutter, Amnionitis	einseitige/beidseitige feinfleckige Verschattungen, evtl. Pleuraergüsse	- moderat- hoch - persistierend bis ansteigend	kultureller Keimnachweis / erhöhte Infektionswerte

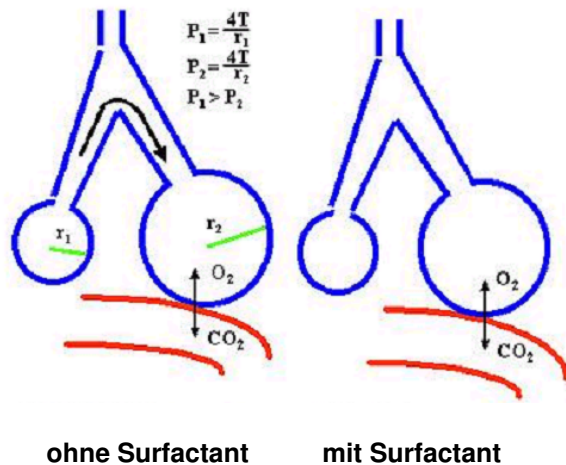
**Tabelle 2:** Diagnostische Kriterien für ein akutes Atemnotsyndrom bei reifen Neugeborenen; modifiziert nach [Möller, 2002]

## 1.3 Surfactant

### 1.3.1 Funktion

Surfactant (**surface active agent**) ist eine stark oberflächenaktive Substanz und bildet in der Lunge die Grenzfläche zwischen Luft und Flüssigkeit. Chemisch, strukturell und funktionell handelt es sich um ein heterogenes Gemisch. Es besitzt neben biophysikalischen, auch immunologische und lokale reinigende Funktionen. Ohne die oberflächenspannungs-reduzierende Wirkung von Surfactant würden die Alveolen bei der Ausatmung unter dem Druck der auf sie wirkenden Oberflächenspannungskräfte kollabieren (LaPlace'sches Gesetz, siehe **Abbildung 1**). Surfactant reduziert die Oberflächenspannung an der Luft-Wasser-Grenze bei

kleiner werdendem Durchmesser der Alveole, sodass ihrer Kollapsneigung in der Ausatmung entgegengewirkt und die Bildung von Atelektasen verhindert wird.



**Abbildung 1:** Gesetz von LaPlace  $P = 4 \times T/r$

( $P$  = Innendruck,  $T$  = Spannung,  $r$  = Radius)

Der Innendruck ( $P$ ) in der Alveole ist umgekehrt proportional zu ihrem Radius ( $r$ )

Ohne Surfactant kommt es zur Volumenverschiebung in Richtung größere Alveole mit folglich Kollaps der kleineren Alveole ( $P_1 \gg P_2$ ).

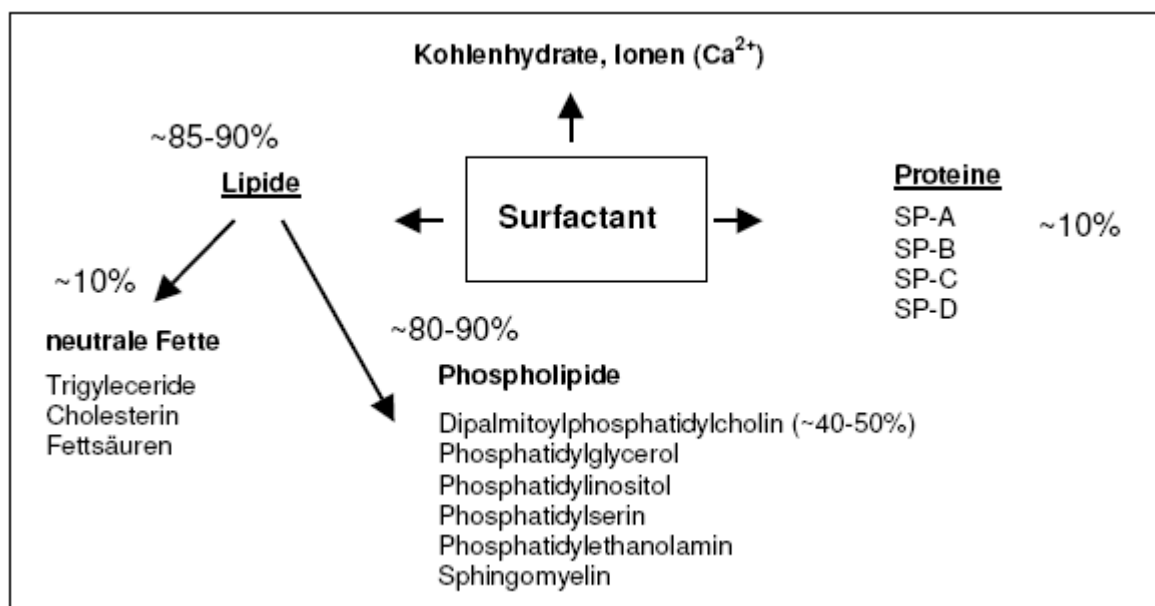
Surfactant senkt die Oberflächenspannung gegen Null und die Alveolen bleiben stabil unabhängig von ihrer Größe.

modifiziert nach [Floros and Lin, 1999]

Für die postnatale Adaptation und normale Atmung ist Surfactant unverzichtbar. Surfactant verhindert den Kollaps der Alveolen, insbesondere im Endexpirium, und trägt zu deren mechanischen Stabilisierung wesentlich bei, sodass die wichtige homogene Belüftung der Lunge gewährleistet ist. Erstmals 1929 postulierte der Physiologe Kurt von Neegaard [von Neegaard, 1929] die Existenz eines natürlichen pulmonalen Detergens, das die Oberflächenspannung beeinflusst. Clements et al. bewiesen 1957, dass die Lunge selbst die Oberflächenspannung reguliert, indem sie einen „anti-atelectasis“-Faktor produziert [Clements, 1957]. 1961 konnten Klaus et al. dem Phospholipidanteil und hier in erster Linie dem Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) die spannungsreduzierende Wirkung des Surfactant nachweisen [Klaus and Clements, 1961; Clements, 1977]. Weitere Studien entschlüsselten die wichtige Rolle der Surfactant-assoziierten Proteine sowohl bei der Verminderung der Oberflächenspannung [King et al., 1973] als auch bei der lokalen Immunität der Atemwege [van Iwaarden et al., 1990; Pison et al., 1994]. In Rahmen dieser immunologischen Aufgaben kommt es zu einer Aktivitätssteigerung der Makrophagen, die zur Förderung der Phagozytose eingeatmeter Partikel und Bakterien führt.

### 1.3.2 Zusammensetzung

Surfactant ist ein komplexes Gemisch, das sich zu ca. 85-90% aus Lipiden, 10% aus Proteinen und einem restlichen Anteil aus Kohlenhydraten und Ionen zusammensetzt (siehe **Abbildung 2**). 80-90% der Lipide sind Phospholipide, von denen mit ca. 40-60% den Hauptanteil das Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) stellt [Creuwels et al., 1997; Haagsman and van Golde, 1991]. Den restlichen ca. 10%tigen Anteil bilden die neutralen Fette, von denen das Cholesterin als größte Fraktion nachweisbar ist. In der Proteinfraktion finden sich die vier Surfactant-assoziierten Proteine: SP-A, SP-B, SP-C und SP-D [Possmayer, 1988]. Die Surfactantproteine SP-B und SP-C sind hydrophob, während SP-A und SP-D hydrophile Proteine sind und zur Familie der Collectine gerechnet werden [Johansson et al., 1994].

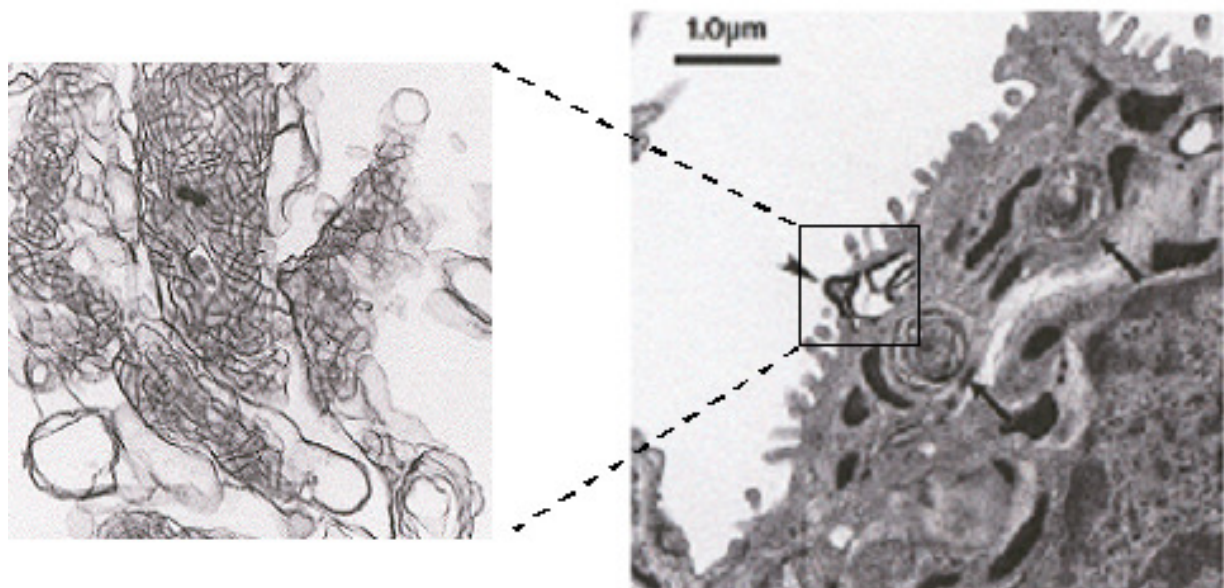


**Abbildung 2:** Zusammensetzung des pulmonalen Surfactants

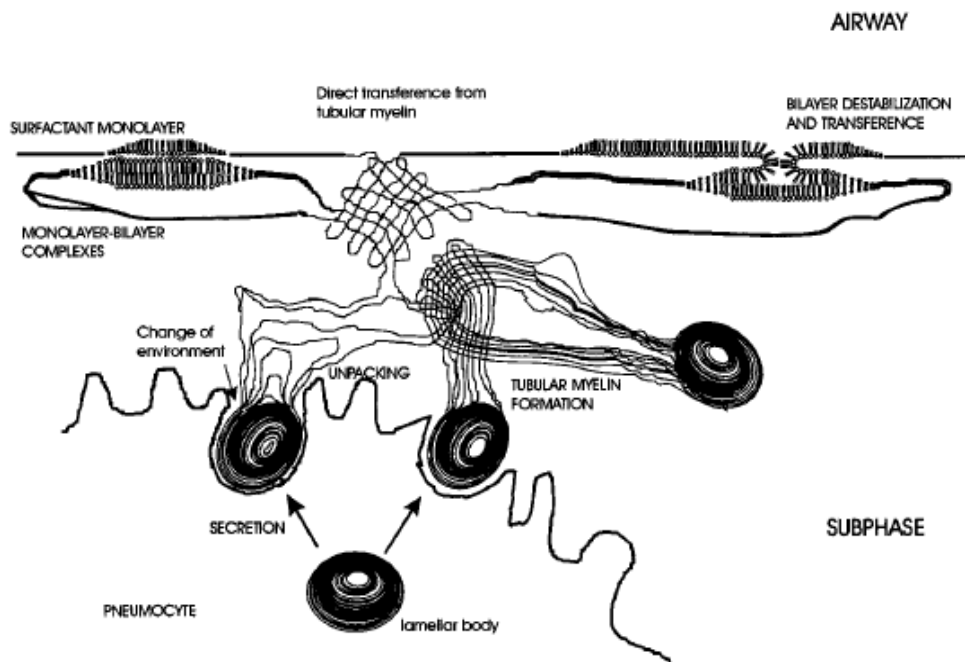
### 1.3.3 Metabolismus

Alle Surfactant-Bestandteile werden in der Lunge im endoplasmatischen Retikulum der Typ-II-Pneumozyten gebildet, gespeichert und dann in den Alveolarraum ausgeschieden. Die Surfactantproteine SP-A und SP-B werden zusätzlich in anderen pulmonalen Epithelzellen, wie Clara-Zellen, Bronchial- und Trachealepithelzellen produziert [Nogee, 1998]. SP-B und SP-C werden zunächst als

größere Präkursorproteine synthetisiert und über das Golgi-Apparat zu den *multivesicular bodies* (MVB) weitertransportiert. In mehreren Schritten wird das reife Surfactantprotein aus dem Präkursorprotein herausgeschnitten. Die MVB fusionieren zu Lamellarkörperchen (*lamellar bodies*, LB), in denen SP-B und SP-C mit den Phospholipiden gespeichert werden [Voorhout et al., 1993]. SP-A und SP-D können hingegen an den LB vorbei von der Zelle in den Alveolarraum sezerniert werden. Die Sekretion des Surfactant beginnt mit der Verschmelzung der LB mit der Zellmembran, um dann in die Hypophase, dem Flüssigkeitsraum direkt an der Alveolenoberfläche, zu gelangen. Dort entfalten sich die LB und aus den vier Surfactant-assoziierten Proteinen, dem DPPC und dem Phosphatidylglycerol entsteht in Anwesenheit von zweiwertigem Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) das tubuläre Myelin, eine gitterähnliche Röhrenstruktur, die die Vorstufe des aktiven Surfactant darstellt (siehe **Abbildungen 3a, 3b** und **4**) [Rooney et al., 1994; Nag et al., 1999]. In in-vitro Versuchen bildeten sich ohne SP-B multilamilläre Strukturen und ohne die Anwesenheit des hypophilen Proteins SP-A fanden sich nur diskoide Partikel [Williams et al., 1991]. In Kulturen von Typ II Pneumozyten, die nicht in Kontakt mit Luft, sondern mit einer Flüssigkeit standen, fand sich nicht die bekannte Struktur des tubulären Myelins, ebenso keine Lamellarkörperchen [Dobbs et al., 1997].



**Abbildungen 3a und 3b:** Zwei Lamellarkörperchen (rechtes Bild, Pfeile) und tubuläres Myelin (linkes Bild) [Korfhagen et al., 1996]



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Sekretion von Surfactant [Perez-Gil and Keough, 1998]

Das tubuläre Myelin generiert kontinuierlich den surfactanttypischen Film an der Luft-Wasser-Grenze. Dieser Film besteht aus einem besonders DPPC-reichen Lipid-Monolayer, der von einer angrenzenden Bilayer-Struktur ständig mit Lipiden und Proteinen versorgt wird [Veldhuizen et al., 2000].

Verbrauchtes Surfactant wird größtenteils wieder von den Pneumozyten Typ II aufgenommen und wiederverwertet [Fisher et al., 1987a]. Nur ein kleiner Teil des Surfactant wird von Alveolarmakrophagen abgebaut oder über die Atemwege und das Lymphsystem abtransportiert.

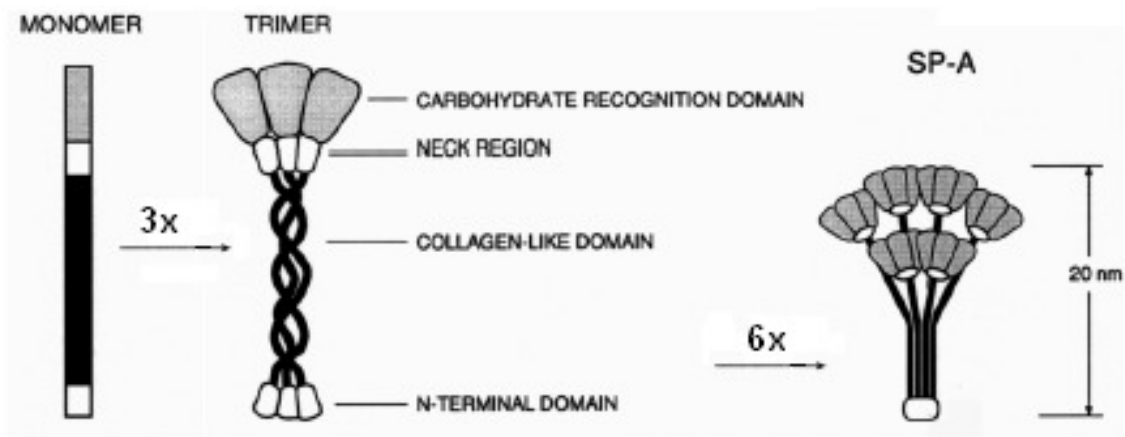
### 1.3.4 Surfactant-assoziierte Proteine (SP)

#### SP-A

##### *Metabolismus und Struktur des SP-A*

Das hydrophile SP-A stellt mit 50% den größten gewichtsbezogenen Anteil der Surfactantproteine [McCormack, 1998]. Zwei Gene SP-A1 und SP-A2 und ein Pseudogen kodieren auf dem langen Arm von Chromosom 10 als Genprodukt ein 248 Aminosäure langes Propeptid [Fisher et al., 1987b]. Durch Abspaltung einer 20 AS langen Signalsequenz und verschiedene posttranslationale Modifikationen

entstehen die jeweiligen SP-A1- und SP-A2-Monomere. Das SP-A-Monomer ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 28 kDa und gehört zu der Gruppe der Kollektine. Das vollständig entwickelte 650 kDa große SP-A-Molekül bildet ein Oligomer aus 18 Einheiten, die sich aus sechs Trimeren als Octadecamer räumlich ähnlich einem Blumenstrauß anordnen (siehe **Abbildung 5**) [Voss et al., 1988]. SP-A wird ausschließlich in der Lunge in Pneumozyten Typ II exprimiert.



**Abbildung 5:** Struktur und Aufbau von SP-A [Haagsman and Diemel, 2001]

### ***Immunologische und biophysikalische Bedeutung von SP-A***

Das Surfactantprotein SP-A spielt eine wichtige Rolle insbesondere in der lokalen Immunität der Lunge. SP-A Moleküle können mit ihrer kollagenartigen Domäne wie Komplementfaktor C1q und mannosebindendes Protein durch Bindung an CD-14-Rezeptoren auf Alveolarmakrophagen und Monozyten das unspezifische Abwehrsystem aktivieren [Sano et al., 1999; Nepomuceno et al., 1997; Malhotra et al., 1992]. Die in der globulären Domäne lokalisierte  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Erkennungsregion für Kohlenhydrate (*carbohydrate recognition domain*, CRD) besitzt die Fähigkeit, sich an Strukturen von Mikroorganismen zu binden (Opsonierung). Komplexe Oligosaccharide an der globulären Domäne vermitteln zudem die Bindung an Mykobakterien und an virale Proteine [Pasula et al., 1999; Benne et al., 1995].

Neben der Abwehrfunktion nimmt SP-A Einfluss auf die Regulation des Surfactantmetabolismus, auf die Umwandlung der Lamellarkörperchen in tubuläres Myelin und dessen Stabilisierung. Natives alveoläres Surfactant liegt als tubuläres Myelin vor, einer gitterartigen Struktur, die durch die Position von SP-A im Gitter

stabilisiert wird [Voorhout et al., 1991]. Darüber hinaus beschleunigt SP-A die Phospholipid-Anreicherung an der Wasser-Luft-Grenze [Creuwels et al., 1997]. Die Funktion von SP-A konnte an gentechnisch veränderten Mäusen, die aufgrund einer vollständigen Deletion der kodierenden Gene kein SP-A synthetisieren (SP-A knockout Maus, SP-A(-/-)), untersucht werden. Das völlige Fehlen von SP-A zeigte keinen Einfluss auf die Lungenfunktion, jedoch waren die Tiere empfindlicher gegenüber bakterielle Infektionen. Elektronenoptisch konnte in den Alveolen von SP-A(-/-) Mäusen tubuläres Myelin nicht nachgewiesen werden [Ikegami et al., 1998; Ikegami et al., 1997].

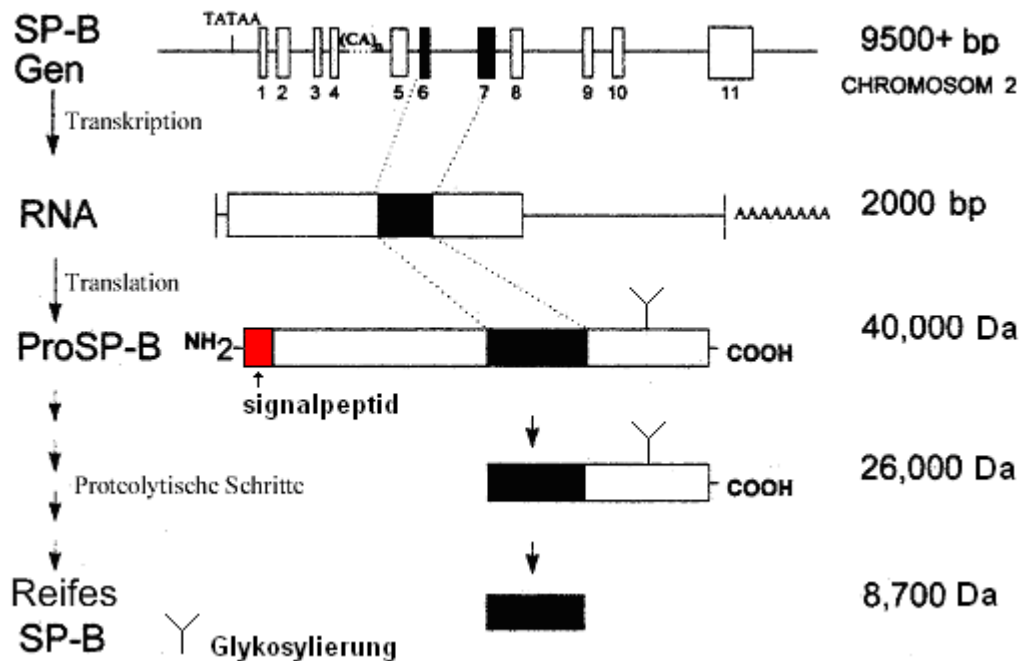
## **SP-B**

Bei dem Surfactantprotein B handelt es sich um ein lipophiles Molekül mit einem Molekulargewicht von 8,7 kDa und einer Länge von 79 Aminosäuren. Unter den Surfactantproteinen ist SP-B das einzige, das essentiell für die postnatale pulmonale Adaptation und damit das Überleben ist.

### ***Metabolismus und Struktur von SP-B***

Das SP-B ist auf einem Genlokus auf dem kurzen Arm des Chromosoms 2 kodiert [Emrie et al., 1988]. Das komplette Gen wurde als eine relativ kurze Sequenz von ca. 9,5 kbp entschlüsselt [Pilot-Matias et al., 1989]. Das Gen besteht aus 11 Exons, wobei das 11. Exon nicht translatiert wird. Phelps et al. wiesen SP-B mRNA in Typ-II-Alveozyten und Clara-Zellen nach, in letztere findet die Synthese nur in geringem Umfang statt [Phelps and Floros, 1988]. In der Lunge wird SP-B zunächst aus einer 2000 Bp langen mRNA als ein 381 Aminosäuren großes Präprotein synthetisiert. In Folge führen mehrere proteolytische Abspaltungen und Modifikationen zum reifen SP-B Protein, das letztendlich von Exon 6 und 7 kodiert wird (siehe **Abbildung 6**).





**Abbildung 6:** Syntheseschritte des SP-B [Nogee et al., 1998]

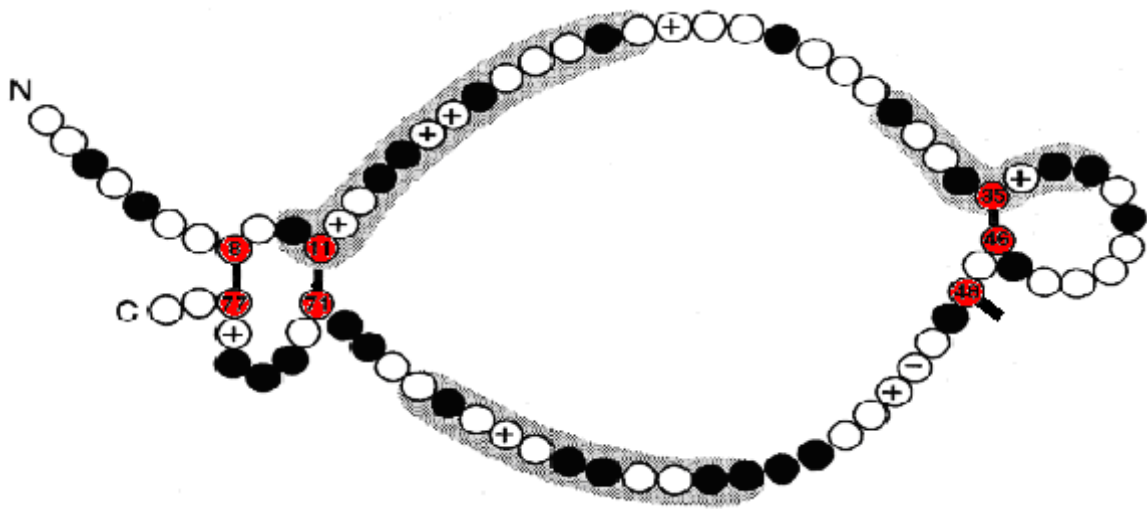
Wie aus **Abbildung 6** ersichtlich, setzt sich das ProSP-B Protein aus dem reifen SP-B Protein flankiert von einem C-terminalem- und N-terminalem Propetid, an das ein Signalpeptid anschließt, zusammen. In diesen Bereichen des SP-B Vorläufers werden die Synthese und Sezernierung des reifen SP-B Moleküls modifiziert. Nach der Transkription in die mRNA findet an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums der Translationsschritt in das ProSP-B Peptid statt. Das Signalpeptid vermittelt den Übertritt dieses Präproteins in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums und wird anschließend abgespalten. In Versuchen mit Hamstern führte ein Fehlen des N-Terminus zur Akkumulation des SP-B im endoplasmatischen Retikulum [Lin et al., 1996; Lin et al., 1996]. Das N-terminale Propeptid übernimmt in Anwesenheit von maturem SP-B eine wichtige Funktion beim weiteren Weg des SP-B Propeptids über das Golgi-Apparat zu den multivesikulären Körperchen (MVB) und deren Formation zu Lamellarkörperchen. Die Einwirkung des SP-B auf die Vesikelfusion wurde von Poulain et al. in vitro nachgewiesen [Poulain et al., 1996]. Des weiteren beobachtet man bei SP-B(-/-) Mäusen eine Vermehrung von MVB, wohingegen reife LB völlig fehlen [Clark et al., 1995]. Die Homöostase der Lamellarkörperchen wird durch das C-terminale Proprotein reguliert, was sich in transgenen Mausmodellen, die das SP-B ohne den C-Propeptid exprimieren, in einer

deutlichen Größenzunahme der LB nachweisbar ist [Akinbi et al., 1997]. Die Prozessierungsvorgänge des SP-B finden wahrscheinlich in MVB statt. Dies zeigten Versuche mit polyklonalen Antikörpern [Korimilli et al., 2000; Voorhout et al., 1992]. Weitere Abläufe in der Synthese des reifen SP-B sind die Glykosylierung am C-terminalen Ende, deren funktionelle Bedeutung jedoch noch nicht bekannt ist, und die ebenfalls noch nicht ganz entschlüsselte Prozessierung des C-Terminus. Die funktionelle Bedeutung des C-Terminus wurde im Mausmodell von Akinbi et al. deutlich, als das isolierte Fehlen des C-terminalen Propeptids die Synthese von SP-C beeinflusste, sodass neben reifem SP-C auch SP-C-Intermediärprodukte auftraten. Die gleichen Zwischenprodukte fanden sich auch in den Lungen von SP-B(-/-) Mäusen [Akinbi et al., 1997].

Das mature aus 79 Aminosäuren bestehendes SP-B Peptid ist reich an Cystein [Curstedt et al., 1988]. Das monomere SP-B ist über drei intramolekulare Disulfidbrücken zwischen Cys-8-77, Cys-11-71 und Cys-35-46 zu einer Schleife verknüpft (siehe **Abbildung 7**). Über eine intermolekulare Disulfidbrücke an Position Cys-48 entsteht das dimere SP-B. Die Sekundärstruktur des SP-B ist hauptsächlich  $\alpha$ -helikal [Vandenbussche et al., 1992], zu deren Flexibilität und außergewöhnlich thermischen Stabilität die Disulfidbrücken beitragen. Intraalveolär findet man das SP-B vorwiegend (ca. 90%) in seiner dimeren Form.

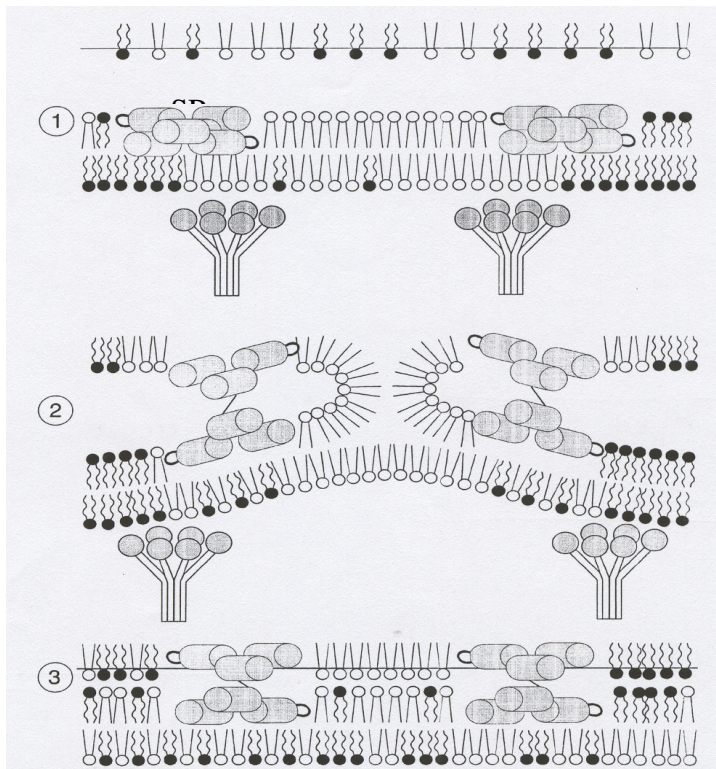
### ***Biophysikalische und metabolische Funktionen des SP-B***

Die Funktion des SP-B kann man in intra- und extrazelluläre Effekte differenzieren. Zweifellos ist die wichtigste Funktion des SP-B die Optimierung der biophysikalischen Eigenschaften des Surfactants in seiner Oberflächenspannung-reduzierenden Wirkung durch die schnelle Anreicherung des Lipid-Monolayers mit DPPC. Erkenntnisse und hypothetische Modelle über die Anreicherung der Wasser-Luft-Grenzschicht mit Phospholipiden und biophysikalische Eigenschaften von Surfactantkomponenten wurden mit Hilfe von Experimenten mit dem Surfactometer gewonnen. Diese Apparatur erzeugt in den Durchmessern standardisierte Blasen. Durch Messung der Druckdifferenz an der Phasengrenze der Blase wird nach der Formel  $\Delta P = 2 \gamma r^{-1}$ , dem Laplace' schen Gesetz, die jeweilige Oberflächenspannung ( $\gamma$ ) berechnet.

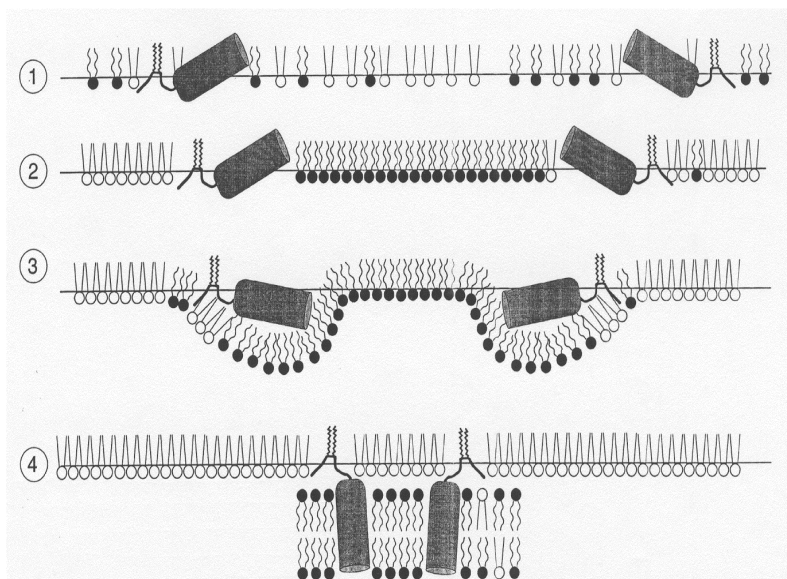


**Abbildung 7:** Monomere Struktur des SP-B (hervorgehoben sind die Disulfidbrücken) [Creuwels et al., 1997]

Auf dem Boden experimenteller Daten wird postuliert, dass der Lipid-Monolayer durch selektives Einfügen von DPPC-reichen Domänen durch Dehnung des Films während der Inspiration oder Herausdrängen von nicht-DPPC-Lipiden durch die Kompression während der Expiration modifiziert wird (siehe **Abbildungen 8a** und **8b**) [Schurch et al., 1992; Veldhuizen et al., 2000; Veldhuizen and Haagsman, 2000].



**Abbildung 8a:**  
SP-B ist eingebettet in der Doppellipidschicht der Interphase (1). Durch Verbindung mit dem Monolayer (2) fügt es während der Inspiration auftretende Dehnung DPPC-Moleküle ein (3).

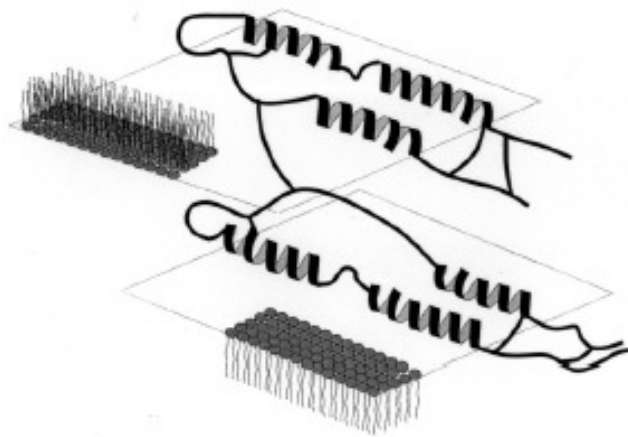


**Abbildung 8b:**  
SP-C ist im Monolayer zu finden (1). Während der Expiration wird die Schicht deformiert und mit Hilfe von SP-C werden nicht-DPPC-Moleküle aus der Grenzschicht herausgedrängt (2-3):

**Abbildungen 8a und 8b:** In vitro Modelle für selektive Insertion von DPPC-reichen Lipiddomänen (oben) und Herausdrängen von nicht-DPPC-Lipiden (unten) zur Anreicherung der Phospholipidschicht [Veldhuizen and Haagsman, 2000]

Zusammen mit SP-A und Calcium ist SP-B an der Bildung des extrazellulären tubulären Myelins beteiligt [deMello et al., 1994a; Poulain et al., 1992; Williams et al., 1991]. SP-B besitzt außerdem eine modifizierende Wirkung auf Lipidmembranen und

zeigt die Fähigkeit, Membranen miteinander zu verbinden (siehe **Abbildung 9**). Durch fusionierende und auftrennende Eigenschaften spielt es bei der Bildung der Lamellarkörperchen in den Pneumozyten Typ II eine wichtige Rolle [Poulain et al., 1992]. Das Surfactantprotein B ist verantwortlich für die schnelle Anreicherung des Lipid-Monolayers mit Phospholipiden. Schließlich reguliert es die Wiederaufnahme und Verwertung verbrauchter Surfactantkomponenten durch die Pneumozyten Typ II [Whitsett et al., 1995].



**Abbildung 9:** Struktur und hypothetische Position von SP-B zwischen zwei Membranstrukturen [Haagsman and Diemel, 2001]

### ***Immunologische Funktionen von SP-B***

In letzten Jahren werden auch dem SP-B immunologische Funktionen in der Lunge zugeschrieben [van Iwaarden et al., 2001]. Epaud et al. etablierten genmanipulierte Mausmodelle, in denen die Auswirkung unterschiedlicher SP-B Genexpressionen auf die Lungenfunktion und inflammatorische Reaktion bei intratrachealer Applikation von Lipopolysaccharid (LPS) untersucht wurden [Epaud et al., 2003]. Tiere mit doppelter Anlage des SP-B Gens (SP-B(++/++)) exprimierten im Vergleich zu SP-B(+/-) Wildtyp und heterozygoten SP-B(+/-) Genotyp 5,6 fach mehr an SP-B und die SP-B überexprimierenden Mäuse zeigten in Gegensatz zu Wildtyp und Heterozygoten nach Applikation von LPS eine unveränderte Lungencompliance und normale Oberflächeneigenschaft des Surfactantsystems. Beim Wildtyp und heterozygoten SP-B Mangel ergab die histologische Analyse eine ausgeprägte

inflammatorische Reaktion, die hingegen bei SP-B überexprimierenden Mäusen vermindert war. Aus den Ergebnissen anderer Studien, die eine Modulation der systemischen Antigenantwort nach intratrachealer Applikation von Antigen durch SP-B beschrieben, kann ebenfalls eine immunmodulatorische Funktion von SP-B abgeleitet werden [van Iwaarden et al., 2001].

### **Weitere Funktionen des SP-B**

Neben den obigen biophysikalischen, metabolischen und immunologischen Funktionen des SP-B werden noch weitere wichtige Eigenschaften im Rahmen der Steuerung der intrauterinen Lungenentwicklung dem SP-B zugeschrieben. Studien zeigten, dass für eine adäquate Lungenentwicklung das Zusammenspiel des leukämie-inhibierenden Faktors mit dem insulinartigem Wachstumsfaktor IGF-1 und dem SP-B obligat ist [Pichel et al., 2003]. Eine verzögerte Lungenentwicklung konnte auch in transgenen Mäusen mit gestörter Aktivierung der humanen SP-B Promoterregion beobachtet werden [Strayer et al., 2002].

### **SP-B Mangel**

Im Gegensatz zu Mangel an den anderen drei Surfactantproteinen, ist ein absoluter Mangel an SP-B mit dem Leben nicht zu vereinbaren. Dies wurde unter anderem an tierexperimentellen Untersuchungen mit genmanipulierten Mäusen gezeigt. Nur die SP-B(-/-) Maus verstarb postnatal an einer respiratorischen Insuffizienz. Bei heterozygoten SP-B(+/-) Mäusen waren Lungencompliance und Residualvolumen verringert und die Kollapsneigung der Alveolen erhöht. Auch die Menge an synthetisierten SP-B war geringer. Keine Veränderungen fanden sich hingegen im Wachstumsverhalten, in der Lungenmorphologie und in der intra- und extrazellulären Phospholipid-Pool Größe [Clark et al., 1995; Tokieda et al., 1997]. Lin et al. konnten zeigen, dass der SP-B Mangel auch nicht durch die SP-B Synthese in Clara-Zellen kompensiert werden konnte [Lin et al., 1999]. Ein Mangel an SP-A, -C und -D äußerte sich in Tierstudien in einem veränderten oder gestörten Surfactantmetabolismus, ohne jedoch die postnatale pulmonale Adaptation zu beeinflussen [Botas et al., 1998; Weaver and Conkright, 2001; Korfhagen et al., 1996]. Beim Menschen zeigt sich der absolute SP-B Mangel bei Neugeborenen als eine Form der kongenitalen Alveolarproteinose (*congenital alveolar proteinosis*, CAP). 1993 konnte Noguee et al. erstmals die 121ins2-Mutation im SP-B Gen als eine

Ursache dieser seltenen Lungenerkrankung des Neugeborenen beschreiben. Sie ist zugleich die häufigste Ursache der CAP. Auf Grund der Insertion von zwei Basenpaaren (GAA statt C) im Kodon 121 des Exon 4 entsteht eine Verschiebung des Leserahmens mit der Folge, dass die Translation des mutierten SP-B Gens frühzeitig abgebrochen wird [Nogee et al., 1994] und die entstehende mRNA instabil ist und schneller abgebaut wird [Beers et al., 2000] und ein völliges Fehlen des SP-B resultiert. Außerdem zeigten Untersuchungen des Lungengewebes eine stark reduzierte Lamellarkörperchenzahl und das Fehlen des tubulären Myelins [deMello et al., 1994a]. Betroffene Neugeborene können nur durch die Lungentransplantation behandelt werden. Endotracheal appliziertes Surfactant mit SP-B führt kurzfristig zur Besserung der Lungenfunktion, sodass die Kinder nur bis zu einer möglichen anstehenden Lungentransplantation stabilisiert werden können [Hamvas et al., 1997; Hamvas et al., 1994]. Die Häufigkeit des 121ins2-Allels schätzt man auf 1 unter 1000-3000 Menschen [Cole et al., 2000]. Heterozygote Erwachsene zeigen entsprechend bislang publizierter Daten keine Einschränkungen der Lungenfunktion im Verlauf der ersten 40 Lebensjahre [Yusen et al., 1999].

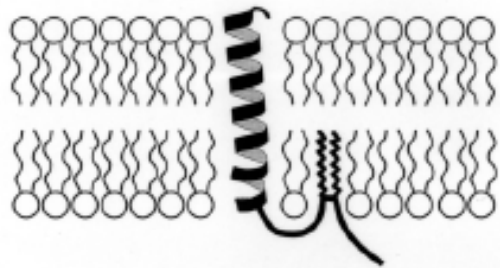
## SP-C

### ***Metabolismus und Struktur von SP-C***

SP-C ist eines der am stärksten hydrophoben Proteine des Organismus und ist besonders reich an verzweigt-kettigen Aminosäuren. Bei dem reifen SP-C Molekül handelt es sich um ein sehr kleines aus 35 Aminosäuren bestehendes Polypeptid eines Molekulargewichts von 3,5 - 4 kDa. Als Besonderheit verfügt SP-C über ein Poly-Valin Anteil, der in einer  $\alpha$ -Helix Form vorliegt (siehe **Abbildung 10**). SP-C wird als einziges Surfactantprotein ausschließlich in der Lunge gebildet [Fisher et al., 1989; Glasser et al., 1987]. Der genetische Code des SP-C befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 8. Das SP-C Protein wird wie SP-B in Typ II-Pneumozyten als Präprotein synthetisiert, das über mehrere Prozessierungsschritte läuft und dann als reife Form über die LB intraalveolär sezerniert wird. Bei der Prozessierung des reifen SP-C spielt auch SP-B eine wichtige Rolle. Clark et al. zeigten in genmanipulierten SP-B knockout Mausmodellen eine intraalveoläre Akkumulation eines unvollständig prozessierten SP-C Peptids und eine starke

Verminderung des muren Proteins. Die Expressionsrate, d.h. der Gehalt an SP-C mRNA, blieb aber unverändert [Clark et al., 1995].

Die Lamellarkörperchen sind somit für Phospholipide und Surfactantproteine B und C als intrazelluläre Speicher zu sehen. Die Verwertung und Aufnahme von „verbrauchtem“ SP-C aus dem Alveolarraum in die Pneumozyten Typ II ähnelt dem von SP-B und kann durch SP-A gesteigert werden [Pinto et al., 1995; Pinto et al., 1993].



**Abbildung 10:** Struktur und vermutete Position des SP-C im Bilayer [Haagsman and Diemel, 2001]

### ***Biophysikalische Funktionen***

Die Funktionen des SP-C ergänzen sich in vielem mit den des SP-B. Die Hauptaufgabe des SP-C ist auch die Aufrechterhaltung der biophysikalischen Eigenschaft des Surfactant, indem es die Adsorptionsrate von Phospholipiden an der Luft-Wasser-Grenzschicht steigert. Wie SP-B trägt es zur Stabilität der Oberflächenaktivität des Surfactantfilms bei. Zusätzlich wird die Widerstandsfähigkeit des Surfactants gegenüber inhibierende Einflüsse von Serum-Proteinen erhöht [Amirkhanian et al., 1993].

Jedoch ist ein absoluter SP-C Mangel im Gegensatz zu SP-B postnatal nicht letal, denn SP-C knockout Mäuse zeigen unveränderte Surfactantsynthese und Lungenmorphologie sowie pulmonale Adaptation. Erst im Alter von mehreren Monaten kam es zu Langzeitkomplikationen des SP-C Mangels wie interstitielle Pneumonitis und Emphysembildung [Glasser et al., 2001]. Auch die Expression von pathologisch verändertem SP-C hat in transgenen Mäusen schwere pulmonale Anomalien zur Folge [Bridges et al., 2003]. Genetische Variationen im SP-C Gen führen beim Menschen zur Ausbildung einer interstitiellen Lungenerkrankung oder zur Produktion eines abnormen SP-C [Nogee et al., 2001; Hamvas et al., 2004], wobei die genauen Einflüsse und klinischen Folgen des fehlenden oder aberranten



SP-C auf den Surfactantmetabolismus oder die Oberflächeneigenschaften in den Einzelheiten noch unklar sind.

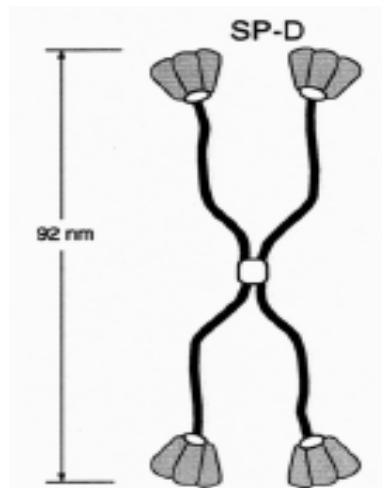
### ***Immunologische Funktionen des SP-C***

Tierexperimentelle Untersuchungen über die Wechselwirkung von SP-C mit LPS und CD-14-Rezeptoren auf Makrophagen zeigten, dass an Lipid-Vesikel gebundenes SP-C im Gegensatz zu SP-B die LPS-Bindung an Makrophagen dosisabhängig hemmt. SP-C inhibiert die Reduktion der LPS-induzierten Produktion von TNF- $\alpha$  durch Makrophagen [Augusto et al., 2001]. Im Tiermodell der Mekoniumaspiration unserer Gruppe fanden sich ähnlich interpretierbare Ergebnisse mit einer deutlichen Inhibition der Expression von Interleukin-1 durch ein intratracheal appliziertes rekombinantes SP-C-haltiges Surfactantpräparat [Hilgendorff et al., 2003]. Obige Studien deuten auf eine weitere Funktion von SP-C in der Modulation der pulmonalen Abwehrreaktion hin.

## **SP-D**

### ***Metabolismus und Struktur des SP-D***

Beim SP-D handelt es sich, ebenso wie beim SP-A, um ein hydrophiles Kollektin, das auf dem langen Arm des Chromosoms 10 kodiert wird. Das Molekulargewicht des reifen SP-D-Monomers beträgt 43 kDa. Die Struktur des SP-D ähnelt dem SP-A-Molekül. In der Lunge vorliegendes SP-D setzt sich aus 12 Monomeren zusammen. Da im Gegensatz zu den anderen Surfactantproteinen, die hauptsächlich an Lipide gebunden sind, sich SP-D zu 70% in gelöster Form im wässrigen Anteil des Surfactant befindet, ist seine Rolle für die oberflächenaktiven Eigenschaft des Surfactants umstritten.



**Abbildung 11:** Struktur des SP-D [Haagsman and Diemel, 2001]

### ***Funktionen des SP-D***

Bei genmanipulierten SP-D(-/-) Mäusen zeigten sich keine postnatalen Adaptationsstörungen, jedoch kam es zur Bildung von Riesenlamellarkörperchen und einer gesteigerten Phagozytose von Surfactantbestandteilen durch Alveolarmakrophagen [Kuroki et al., 1991]. Außerdem zeigten Poulain et al. in vitro einen SP-D Effekt, der die Bildung einer atypischen hochdifferenzierten und oberflächenaktiven tubulären Struktur bewirkt [Poulain et al., 1999].

Die Hauptaufgabe des SP-D liegt aber im immunologischen System der Lunge und trägt mit SP-A zur lokalen pulmonalen Immunkompetenz bei [Gortner and Hilgendorff, 2004]. SP-D besitzt die Fähigkeit, sich an bakterielle Lipopolysacchariden oder andere Zelloberflächen zu binden und so Bakterien und Alveolarmakrophagen zu vernetzen. Alveolarmakrophagen von SP-D defizienten Mäusen phagozytieren in vitro weniger Streptokokken der Gruppe B, Haemophilus influenza und Influenza A. Ähnlich wie bei SP-A(-/-) Mäusen führen pulmonale Infektionen zu stärkeren inflammatorischen Reaktionen in genmanipulierten SP-D(-/-) Mäusen [LeVine et al., 2004; LeVine et al., 2001; LeVine et al., 2000]. Epidemiologische Studien zeigten eine Assoziation bestimmter Einzelnukleotid-Polymorphismen im SP-D Gen mit infektiösen pulmonalen Erkrankungen [Lahti et al., 2002; Floros et al., 2000]. Eine weitere Assoziation zwischen Polymorphismen im SP-D Gen und erniedrigten Serumspiegel von SP-D bei gesunden Erwachsenen wurde kürzlich von Heidinger et al. beschrieben [Heidinger et al., 2005].

## 1.4 SP-B Polymorphismen

Zusätzlich zu den bereits zuvor genannten häufigsten 121ins2-Mutation im SP-B Gen sind weitere genetische Variationen im SP-B Gen in Zusammenhang mit dem Verlauf respiratorischer Erkrankungen gebracht worden [Williams et al., 1999; Klein et al., 1998; Ballard et al., 1995]. Vor dem Hintergrund der bisher publizierten Daten macht die 121ins2-Mutation rund 2/3 aller bisher bekannten mutanten SP-B Allele aus [Whitsett et al., 1995]. Aufschlussreich darüber hinaus war die Entdeckung der Arbeitsgruppe von Floros et al., dass Längenvariationen im Intron 4 des SP-B Gens das Risiko für RDS erhöhen [Floros et al., 1995]. Sie konnten zeigen, dass Insertion und Deletion von Motiven im Intron 4 zu Längenvariationen führen und dass diese zum Risiko bzw. Verlauf der RDS assoziiert sind. Bereits zuvor war bekannt, dass die erste Hälfte des Intron 4 aus mehreren ähnlichen Motiven besteht, wobei jedes Motiv sich jeweils aus einem 20 bp langen und einem variablem CA-Wiederholungen bestehendem Element zusammensetzt [Pilot-Matias et al., 1989]. Floros et al. konnten zeigen, dass die einzelnen Motive durch Basenunterschiede im 20 Bp-Element charakterisiert sind und insgesamt 11 Motive im invarianten Intron 4-Allel nachweisbar sind (siehe **Abbildung 12**).

Motiv-Nr.	Motiv-Sequenz	(CA) <sub>n</sub>
1	GCACCCCAGCCAGCCAG <b>A</b> CA	(CA) <sub>13</sub>
2	GCACCC <b>A</b> AGCC <b>G</b> GCCAGACACAAA	(CA) <sub>3</sub>
3 (Wildtyp)	GCACCCCAGCCAGCCGGACA	(CA) <sub>12</sub>
4	<b>A</b> CACCCCAGCT <b>TG</b> GCCGGACA	(CA) <sub>5</sub>
5	G <b>T</b> ACCCCAGCT <b>TG</b> GCCGGACA	(CA) <sub>6</sub>
6	GCACCC <b>TAT</b> CCAG <b>ACAC</b> ATA	(CA) <sub>5</sub>
7	G <b>T</b> ACCCCAGCCAGCT <b>TGGAA</b> A	(CA) <sub>7</sub>
8	GCAC <b>TCCATCC</b> AG <b>ACAGAT</b> ACC	(CA) <sub>3</sub>
9	G <b>T</b> ACCCCAGCCAGCC <b>AG</b> ACA	(CA) <sub>9</sub>
10	<b>GAG</b>	(CA) <sub>5</sub>
11	GCACCCCAGCT <b>TG</b> GCCG <b>CACA</b>	(CA) <sub>7</sub>

**Abbildung 12:** Aufbau des invarianten Intron 4-Allels aus den 11 Motiven, bestehend aus dem 20 Bp-Element und (CA)<sub>n</sub>-Element. Im 20 Bp-Element sind die Basen, die sich von der Motiv-Sequenz des Wildtyps unterscheiden, fettgedruckt.

Die Längenvariationen entstehen häufiger durch das Fehlen (Deletion) von Motiven und seltener durch die Insertion einzelner degenerierter Motive an bestimmten Bruchstellen (engl. break-points) im  $(CA)_n$ -Element. Die Stelle für die Insertionen und Deletionen fand sich in ihrer Studie ausschließlich im  $(CA)_n$ -Element des 9. Motivs. Die Intron 4-Polymorphismen kommen ausschließlich heterozygot vor, d.h. es liegt immer ein Wildtyp-Allel und variantes Allel vor. Die Häufigkeit des varianten Intron 4-Allels lag nach Floros et al. bei rund 17%.

Diese Ergebnisse von Floros et al. wurden später durch unsere Arbeitsgruppe bestätigt. Makri et al. untersuchten in einem ethnisch homogenen Kollektiv Frühgeborener eines Gestationsalters von 25 bis 32 Wochen mit bzw. ohne RDS und einer Kontrollgruppe gesunder reifer Neugeborener die Häufigkeit von SP-B Polymorphismen im Intron 4 und konnten zeigen, dass der Intron 4-Polymorphismus nicht nur das Risiko sondern auch den Schweregrad des RDS beeinflussen. Die Häufigkeit von Surfactantgabe und Sauerstoffabhängigkeit am 28. Lebensstag bei Frühgeborenen mit Deletion im Intron 4 waren signifikant häufiger als zum genetischen Wildtyp [Makri et al., 2002]. Die Frequenz der Intron 4-Allele mit rund 17% entsprach der von Floros et al. und unterschied sich nicht in der Häufigkeit zwischen gesunden reifen Neugeborenen und Frühgeborenen.

## 1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Von den Ergebnissen der vorstehend zitierten Arbeiten über SP-B Genvariationen in Assoziation zu neonatalen Lungenerkrankungen ausgehend, sollte eine mögliche Assoziation zwischen der 121ins2-Mutation und Intron 4-Polymorphismen im SP-B Gen als genetischer Risikofaktor mit der transitorischen Tachypnoe des Neugeborenen untersucht werden, da nach unserem besten Wissen diesbezüglich bislang keine Arbeiten veröffentlicht wurden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bei reifen Neugeborenen mit einer transienten Tachypnoe SP-B Genvariationen als pathogenetischer Faktor zu untersuchen.

Folgende Fragestellungen standen dabei im Mittelpunkt der Untersuchung:

1. Überprüfung der Existenz von Längenvariationen (Polymorphismen) im Intron 4 des SP-B Gens in einem kaukasischen Patientenkollektiv reifer Neugeborener mit transientser Tachypnoe und gesunder Neugeborener als Kontrollgruppe
2. Bestimmung der Verteilung der Intron 4-Polymorphismen
3. Bestimmung des Aufbaus der Intron 4-Polymorphismen
4. Häufigkeit einer heterozygoten 121ins2-Mutation auf dem SP-B Gen bei TTN-Patienten
5. Untersuchung einer möglichen Assoziation zwischen SP-B Genvariationen (Intron 4-Polymorphismen und 121ins2-Mutation) und der Inzidenz der TTN
6. Überprüfung bereits publizierter Risikofaktoren der TTN anhand der eigenen klinischen Daten

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Patientenkollektiv

In unserer Arbeit untersuchten wir klinische Daten und genomische DNA von insgesamt 157 Patienten indogermanischer (engl. caucasian) Abstammung aus Deutschland, Griechenland und der Türkei. Die Patienten waren reife Neugeborene eines Gestationsalters von größer 37 vollendeten Schwangerschaftswochen, die im Zeitraum zwischen Februar 2000 und August 2002 in den Universitätskliniken der teilnehmenden Studienzentren geboren wurden. Vollblut bzw. Blutproben auf Filterkärtchen wurden mit Einwilligung der Eltern entnommen und zur DNA-Isolation verwendet.

Es wurden 74 Kinder mit transienter Tachypnoe in die Studie einbezogen. Die Diagnose „transiente Tachypnoe“ wurde basierend auf klinischen Zeichen nach Avery et al. und radiologischen Kriterien nach Wesenberg et al. gestellt [Wesenberg et al., 1971; Avery et al., 1966]. Die Neugeborenen zeigten typischerweise eine innerhalb der ersten 24 Lebensstunden auftretende respiratorische Anpassungsstörung mit Atemfrequenzen über 60 pro Minute und zusätzlichem Sauerstoffbedarf über Raumluft. Ausgeschlossen wurden Neugeborene mit Gestationsalter weniger als 37 Wochen. Das Gestationsalter wurde nach der Menstruationsanamnese oder mit Hilfe der pränatalen Ultraschalluntersuchung in der Frühschwangerschaft (10.-12. Woche) bestimmt.

Patienten mit folgenden Erkrankungen oder Charakteristika wurden aus der Studie ausgeschlossen:

- angeborene Pneumonie, Sepsis oder klinischen Zeichen einer Sepsis: basierend auf klinische Symptome mit zu mindestens einem positivem Befund wie erhöhter CrP-Wert, pathologisches Differentialblutbild und I/T-Ratio [Manroe et al., 1979] oder bakteriologisch positiver Blutkulturbefund
- pulmonale Fehlbildungen
- Linksherzversagen oder kardiale Erkrankungen nach echokardiographischer Untersuchung

- Mekoniumaspiration: basierend auf Nachweis von Mekonium im Fruchtwasser und Trachealsekret mit typischem klinischen und radiologischen Bild [Wiswell and Bent, 1993]
- peri- oder postnatale Asphyxie: definiert als Nabelschnurarterien-pH < 7,1 oder Apgar-Score nach 5 Minuten <7
- Kinder von Müttern mit Gestationsdiabetes oder Diabetes mellitus

Zum Vergleich dienten im gleichem Zeitraum geborene gesunde reife Neugeborene als Kontrollgruppe.

Die erste Röntgen-Aufnahme des Thorax des kranken Neugeborenen sicherte die Diagnose der TTN (siehe **Abbildung 13**). Auf den Aufnahmen erkennt man charakteristischer Weise eine diffuse streifige Transparenzminderung als Zeichen des interstitiellen Ödems, z.T. einen prominenten Interlobäerspalt oder auch geringgradige Pleuraergüsse. Insbesondere bei nur diskreter Pathologie des Röntgenbefunds wird die Diagnose TTN retrospektiv nach Ausschluss anderer Ursachen der Ateminsuffizienz gestellt.



**Abbildung 13:** Das Röntgenbild bei transientser Tachypnoe

- Zeichnungsvermehrung: streifenförmig, symmetrisch, betont perihilär
- schleierige Lungeneintrübungen
- Lungenüberblähung
- ggf. kleine intraseptale und/oder Pleuraergüsse
- Herz normal groß, bzw. allenfalls mäßig vergrößert

Die Lungenfunktion der Neugeborenen mit TTN ist wegen der eingeschränkter Belüftung und des interstitiellen Ödems durch ein reduziertes Atemzugvolumen in Folge der erhöhten Atemfrequenz, einer reduzierten Lungencompliance mit erhöhtem Atemwegswiderstand und reduzierter funktioneller Residualkapazität gekennzeichnet [Sandberg et al., 1987].

## 2.2 Untersuchungsmethoden

### 2.2.1 Isolierung von DNA

Die Reinigung der Nucleinsäuren aus Vollblut und Blutfilterkärtchen erfolgte auf der Basis des QIAamp DNA Mini Kit Protokolls. Das Prinzip der DNA-Extraktion läuft in folgenden Schritten ab:

1. Aufbrechen der Blutzellen aus 200 µl EDTA-Blut oder 1cm<sup>2</sup> Blutfilterkärtchen im Lysispuffer mit Proteinkinase K
2. Adsorption der sich im Lysat befindenden DNA von der QIAamp Membran der Spin-Säulen
3. Entfernung von Nebenprodukten und Verunreinigungen mittels Pufferlösungen
4. Eluieren der membrangebundenen DNA

Anschließend wird die DNA-Konzentration und -Reinheit durch Messung der optischen Dichte eines Aliquots bei 260 nm und 280 nm im Spektrophotometer bestimmt. Zur weiteren Bearbeitung wurden die DNA-Proben bei minus 20°C aufbewahrt.

### 2.2.2 Polymerasekettenreaktion

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde 1987 von Kary B. Mullis et al entwickelt. Bei der PCR wird unter kontrollierten Laborbedingungen die gewünschte DNA-Sequenz durch eine DNA-Polymerase (i.d.R. *Taq-Polymerase*) exponentiell vervielfältigt (amplifiziert). Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte. Auf diese Weise ist es möglich, aus einer kleinen Ausgangsmenge durch relativ wenige



Produktionszyklen eine sehr große homogene Population von DNA zu gewinnen, sodass sie identifiziert und weiter verarbeitet werden kann.

### ***Mechanismus der PCR***

Die Vorgänge der PCR ähnelt den Reaktionsschritten der natürlichen DNA-Replikation. Die PCR benötigt neben der zu amplifizierenden DNA-Sequenz als Matrix, auch geeignete Startermoleküle (Primer) und eine thermostabile DNA-Polymerase.

Die PCR-Experimente werden in sogenannten Thermocyclern durchgeführt. Dieser besteht aus einem Reaktionsraum für die Probengefäße, dessen Temperatur über ein selbst zu bestimmendes Programm zu steuern ist. Die PCR beginnt mit der Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges in seine Einzelstränge durch Erhitzen auf ca. 90 °C. Im Anschluss erfolgt in Folge der Abkühlung auf die sog. Schmelztemperatur die Anlagerung (Hybridisierung) der Primer an die einzelsträngige DNA. Dadurch ist es nun für die DNA-Polymerase möglich vom 3'-Ende der Primer ausgehend den Gegenstrang mit freien Desoxy-Nucleotid-Triphosphaten (dNTPs) zu synthetisieren. Die hierfür erforderliche Temperatur entspricht dem Temperaturoptimum (ca. 71 °C) der gewählten Polymerase. Daran anschließend wiederholt sich der Zyklus von neuem, sodass mit jedem Zyklus die gewünschte DNA-Sequenz exponentiell vervielfältigt wird.

### ***Primersequenzen***

Entscheidend für die PCR ist die Konstruktion der Primer. Diese dienen für die Polymerase als Startermoleküle und bestimmen durch Bindung an die Matrizen-DNA die zu kopierende Sequenz. Die Primer sind spezifisch durch ihre Sequenz und Länge, sodass sie im Genom nur die Ziel-DNA eingrenzen und deren Vervielfältigung einleiten.

Alle DNA-Oligomere (Primer) wurden von Carl Roth GmbH&Co. in Karlsruhe in Liefermengen von jeweils ca. 150 µg synthetisiert. **Tabelle 3** zeigt alle verwendeten Primer mit zugehörigen Sequenzen. Diese DNA-Oligomere haben meist eine Länge von etwa 20 bis 24 Nucleotiden mit einem Guanodin/Cytosin-Gehalt von 40% bis 55%. Sie hybridisieren mit der DNA bei Unterschreitung ihrer sogenannten Schmelztemperatur ( $T_m$ ).  $T_m$  berechnet sich nach  $T_m (\text{Primer}) =$

$(A+T) \times 2^{\circ}\text{C} + (G+C) \times 4^{\circ}\text{C}$  und wurde zwischen  $60^{\circ}\text{C}$  und  $65^{\circ}\text{C}$  gewählt mit weniger als  $2^{\circ}\text{C}$ -Differenz zwischen  $T_m(\text{forward-Primer})$  und  $T_m(\text{reverse-Primer})$ .

Primer	Sequenz	Position
Intron 4-RV Hind III mit Restriktionsstelle Hind III (↑)	5'-GCA <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">A↑AG CTT</span> CAT GGC TGA AGG GCA CGT AGT TTC C - 3'	antisense: 3090-3114
Intron 4-FW XHO I mit Restriktionsstelle XHO I (↑)	5'- GCA <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C↑TC GAG</span> TGG TCA TCG ACT ACT TCC AGA ACC - 3'	sense: 2592-2615
Intron 4-FW (markiert mit 5'-FAM)	5'- TGG TCA TCG ACT ACT TCC AGA ACC - 3'	sense: 2592-2615
Intron 4-RV	5'- CAT GGC TGA AGG GCA CGT AGT TTC C - 3'	antisense: 3090-3114
121ins2-FW	5'- GGC CTT GTG TCC AGG GAC - 3'	sense: 2422-2439
121ins2-RV	5'- TGT GTG TGA GAG TGA GGG TGT AAG - 3'	antisense: 3174-3197
GPIIIa-FW	5'- ATT GCT GGA CTT CTC TTT GGG - 3'	sense: 136-156
GPIIIa-RV	5'- GAT AAT TTA AGC AGA CAC GTT CAT - 3'	antisense: 746-769

**Tabelle 3:** Oligonukleotide mit zugehöriger Sequenz und Position

### 2.2.3 PCR-Produkte

Alle PCR-Ansätze setzten sich aus den selben Lösungen und Konzentrationen zusammen, die in folgender **Tabelle 4** aufgeführt sind.

Lösung	Konzentration	Menge
(10x)-reaction buffer incomplete		2,5µl
dNTP-Mix aus dATP,dCTP,dGTP, dTTP	10 mM je Nukleotid	0,6µl
Pwo/Taq-Polymerase	2.5 Units/µl	0,4µl
MgCl <sub>2</sub>	25 nmol/µl	1,8µl
forward-Primer	10 pmol/µl	1µl
reverse-Primer	10 pmol/µl	1µl

**Tabelle 4:** PCR-Ansatz

Entsprechend wurden die einzelnen Ansätze für die PCR mit 120 ng DNA-Probe und Aqua bidestillata zu einer Gesamtmenge von jeweils 25 µl vorbereitet. Die hierbei verwendeten Primersequenzen werden aus **Tabelle 5** ersichtlich.

Die jeweiligen Ansätze wurden mit Hilfe des Peltier Thermal Cyclers automatisch nach folgendem Programm bearbeitet:

Reaktionsschritt		Temperatur	Dauer
initiale Denaturierung		94 °C	120 Sekunden
30 Zyklen	Denaturierung	94 °C	30 Sekunden
	Hybridisierung	58 °C	30 Sekunden
	Extension	68 °C	60 Sekunden
finale Extension		68 °C	20 Minuten

**Tabelle 5:** PCR-Programm

Als Produkte aus den PCR-Versuchen amplifizierten wir mit:

1. Intron 4-Primern: Intron 4-Sequenz für die Fragmentlängenanalyse (FAM-markiert) und für die Sequenzierung (unmarkiert)
2. 121ins2-Primerpaar: Exon 4-Intron 4-Sequenz für die Detektion der 121ins2-Mutation
3. GPIIIa-Primerpaar: Glycoprotein IIIa<sub>Exon 1</sub>-Sequenz als Restriktionskontrolle in der 121ins2-Detektion
4. Intron 4-RV Hind III- und Intron 4-FW XHO I Primerpaar: Intron 4-Sequenz mit Schnittstellen als Klonierungssubstrat (Insert)

#### 2.2.4 Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese wurden die PCR-DNA aufgetrennt und visualisiert. Die Elektrophorese trennt die DNA-Fragmente aufgrund ihrer Größe durch Wanderung in der Gelsubstanz in einem elektrischen Feld auf. Entsprechend unserem Protokoll wurden 2% Agarose-Gele (aus 1g Agarose und 50ml 1xTAE-Puffer) mit 5 µl Ethidium-Bromid vorbereitet. Die Geltaschen wurden jeweils mit Aliquots aus 5µl amplifizierte DNA und 1,20 µl BlueRun beladen. Als Laufpuffer diente 1xTAE-Lösung. Die PCR-Produkte wurden bei einer Spannung von 90 Volt für etwa 50 min aufgetrennt. Als Größenstandard wurden 5 µl der Mischung

bestehend aus 20 µl Standardkonzentrat, 50 µl 5x BlueRun und 180µl aqua bidestillata verwendet. Im Anschluss an die Gelelektrophorese erfolgte das Sichtbarmachen der angefärbten DNA-Banden unter der Ultraviolettstrahlung und die Dokumentation der Ergebnisse auf Fotopapier (siehe **Abbildung 15**). Als Produkt der Elektrophorese konnten mutante und der Wildtyp der Intron 4-Allele detektiert und durch ihre Position zum verwendeten Größenstandard auch ihre Größe grob bestimmt werden.

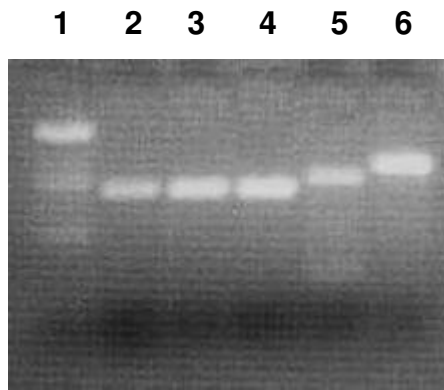
### 2.2.5 Detektion der 121ins2-Mutation (DNA-Restriktion)

Zum Nachweis der 121ins2-Mutation verwendeten wir die Methode der DNA-Restriktion, da das mutante DNA-Fragment eine geeignete Schnittstelle für das Restriktionsenzym BstBI bietet (siehe **Abbildung 14**).

<b>Wildtyp</b>	5'...CTACTTCCCC... 3'
	▼
<b>121ins2-Mutation</b>	5'...CTAC <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">TT↑CGAA</span> CCC... 3'

**Abbildung 14:** Erkennungssequenz mit Schnittstelle ( ↑ ) der BstBI-Endonuclease

Vor der Verarbeitung wurden die PCR-Amplifikate mit QIAquick PCR-Purification Kit nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Über Nacht inkubierten wir die Aliquots aus 30 µl gereinigter DNA, 5 µl aqua bidest., 4 µl 10x NE Buffer 4 und 20 Units BstBI-Restriktionsenzym. Zur Kontrolle der Restriktionsreaktion diente eine PCR-amplifizierte Glycoprotein IIIa<sub>Exon 1</sub>-Sequenz (siehe **Tabelle 3**), die eine geeignete Schnittstelle aufwies. Kontrollaliquots bzw. mutante 121ins2-Fragmente waren danach durch elektrophoretische Auftrennung im 2% Agarosegel unter UV-Belichtung als Doppelbanden zu erkennen (siehe **Abbildung 15**).



**Abbildung 15:** Beispiel einer Gelelektrophorese nach DNA-Restriktion

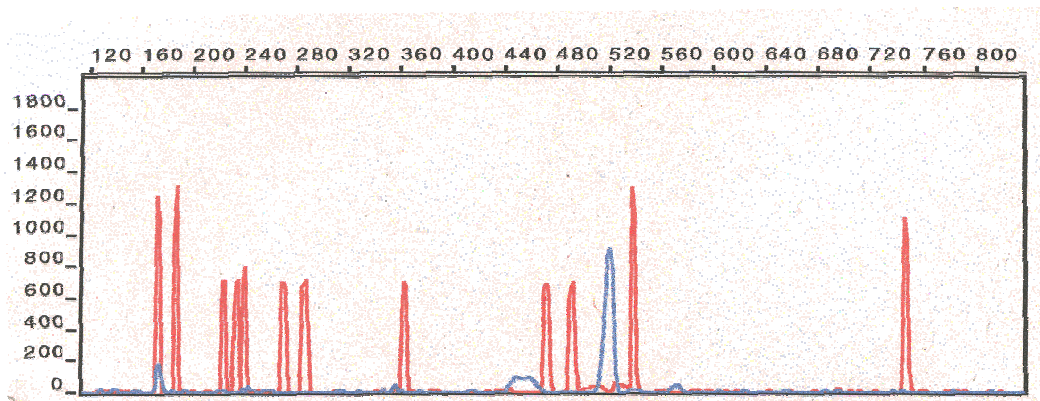
Fach 1: Standard XIV  
 Fach 2 - 4: untersuchte Proben  
 Fach 5: geschnittenes Kontrollaliquot  
 Fach 6: unbehandeltes natives Kontrollaliquot

### 2.2.6 Fragmentlängenanalyse

Mit der Fragmentlängenanalyse (FLA) besteht eine Möglichkeit, die Länge der zuvor in der Gelelektrophorese detektierten varianten Intron 4-Allele, d.h. PCR-Produkte mit einer Größe ungleich 523 bp, exakt zu bestimmen.

Der Analyzer besteht aus einer speziellen Kammer für die Proben, einem Laserscanner und einem Rechner mit Steuerungs- und Auswertungssoftware. Wie bei der Elektrophorese wandern aufbereitete DNA-Proben mit einer von ihrer Länge abhängigen Laufgeschwindigkeit im Gel und erreichen bei verschiedenen Zeitpunkten die Scan-Zone eines Lasers. Auch bei der FLA läuft parallel zur untersuchten Probe ein Standard mit bekannten DNA-Größen, der jedoch zur Unterscheidung mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist.

Der Laserscanner detektiert und differenziert die Lichtsignale der farbstoffmarkierten DNA-Segmente der Probe und des Standards. Abhängig von der Intensität der Lichtsignale und durch Vergleich der Probe mit dem Standard berechnet der Rechner mit Hilfe der Software als Endprodukt das sogenannte Elektropherogramm (siehe **Abbildung 16**). Die einzelnen Fragmente des Standards und der Probe sind als Gipfel zu erkennen, deren Höhen den gemessenen Signalintensitäten entsprechen. Aus der Position der Peaks auf der x-Achse lässt sich so die genaue Länge der Fragmente bestimmen. Heterozygote Allele mit verschiedenen DNA-Fragmentlängen zeigen entsprechend zwei Peaks, die mit den Doppelbanden der Gelelektrophorese vergleichbar sind.



**Abbildung 16:** Elektropherogramm: DNA-Probe mit einer Länge von 520 bp (blau); DNA-Längenstandard (rot)

Der von uns verwendete Genescan-2500 ROX Standard-DNA erlaubte den Vergleich mit DNA-Fragmenten bis zu einer maximalen Länge von 536 bp, sodass längere Allele durch eine Sequenzierung bestimmt werden mussten.

Für die FLA bereiteten wir Aliquots wie folgt vor:

- 1 µl 1:10 verdünntes PCR-Produkt
- + 0,5 µl Genescan-2500 ROX Standard
- + 12 µl Formamid (zur Verhinderung der Bildung von Sekundärstrukturen)

Nach Denaturierung durch Erhitzen auf 90°C und Eisbehandlung für jeweils 2 min führten wir die Analyse in einem Perkin Elmer ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer durch. Die Daten wurden mit der Sequencing Analysis 3.4.1 Software auf einem Power Macintosh (7200/120) analysiert.

### 2.2.7 DNA-Klonierung

Zur genauen Bestimmung der Sequenz eines DNA-Fragments benötigt man dessen Kopie in hoher Zahl und reiner Form. Hierzu bedient man sich der Klonierung, da die DNA-Fragmente aus der PCR mit Fehlern behaftet sein können. Ein Klonierungsexperiment besteht i.d.R. aus folgenden grundlegenden Schritten:

1. Konstruktion eines rekombinierten DNA-Moleküls durch Einführen des DNA-Fragments (Insert) in ein ringförmiges DNA-Molekül (Vektor)

2. Einschleusen (Transformation) des rekombinanten DNA-Moleküls in die bakterielle Wirtszelle
3. Vermehrung der Wirtszelle und mit ihr das rekombinante DNA-Molekül zu Kolonien (Klone)

Ergebnis: jede Kolonie enthält ein einzelnes rekombiniertes DNA-Molekül in vielen Kopien.

Aus genomischer DNA reamplifizierten wir nach bereits beschriebenem Protokoll die varianten Intron 4-Allele mit den Primern Intron 4-FW XHO I und Intron 4-RV Hind III, sodass die PCR-Produkte die Restriktionsstellen XHO I und Hind III enthielten (siehe **Tabelle 3**). Im Anschluss erfolgt die Auftrennung und Darstellung des Allels im 2% Agarosegel. Die Bande wurde aus dem Gel herausgeschnitten und dann mit dem QIAquick Gel Extraction Kit die darin enthaltene DNA isoliert.

Dieses DNA-Fragment (Insert) fügten wir mit dem pBluescript-Vektor zum rekombinanten DNA-Molekül zusammen. Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurde hierzu der Vektor geöffnet und an den Enden der amplifizierten Gensequenz komplementäre Schnittstellen geschaffen, die eine Ligation von Vektor und Insert zu einem Ringkomplex ermöglichen.

Zur Transformation mit dem rekombinanten Plasmid verwendeten wir *Escherichia coli*-Zellen des Stammes JM 101. Sie waren durch Vorbehandlung auf Eis mit  $\text{CaCl}_2$  in „kompetente Zellen“, d.h. Fähigkeit zur Aufnahme von rekombinanter DNA, verwandelt worden. Eine unkontrollierte Ausbreitung der gentechnisch veränderten apathogenen Zellen außerhalb definierter Nährmedien wurde durch einen Selektionsmarker (Thymidin-Zufuhr abhängige DNA-Replikation) unterbunden. Weiterhin wurden die Arbeiten in einem Genlabor der Sicherheitstufe 1 durchgeführt. Für die Klonierung längerer Allele setzten wir das Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit von Invitrogen ein. Der Vorteil dieser Methode liegt in der direkten Insertion von 'blunt-end' PCR-Produkten in einen Plasmid-Vektor, ohne dass vorher eine Restriktion der Inserts erfolgen muss. 4  $\mu\text{l}$  PCR-Produkt wurde zu 10 ng TOPO-Vektor ligiert, die in TOP 10 One Shot Chemically *Escherichia coli*-Zellen kloniert wurden.

Die Selektion der rekombinanten *Escherichia coli*-Klone basiert auf der Untersuchung ihrer Ampicillinresistenz und fehlender  $\alpha$ -Komplementation (d.h. Fehlen des  $\alpha$ -Peptidanteils der  $\beta$ -Galaktosidase). Der Einbau des Plasmids verleiht den transformierten Bakterien eine Ampicillinresistenz. Um die Klone zu identifizieren, die auch das Insert tragen, untersucht man deren  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die  $\beta$ -Galaktosidase wird anteilig vom Bakteriengen und vom Plasmidgen kodiert. Wird das Plasmidgen jedoch durch den (gewünschten) Einbau des Inserts verändert, sind Bakterien mit diesem rekombinanten Plasmid nicht fähig  $\beta$ -Galaktosidase zu bilden und X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid) in ein blaugrünes Indoxylderivat abzubauen. Setzt man Agar X-Gal und als Induktor wirksames IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) sowie Ampicillin zu, so bilden Bakterien mit dem normalem Plasmid blaue und Zellen mit dem rekombinanten Plasmid hingegen weiße Kolonien aus.

### ***Insertion amplifizierter DNA in den Vektor***

50  $\mu$ l des gereinigten Klonierungssubstrats (Intron 4 des SP-B Gens) wurden mit je 10  $\mu$ g p-Bluescript, 35  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 10  $\mu$ l NE Buffer 2 (Restriktionspuffer), 50 Units XHO I und 50 Units Hind III für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden Insert und Vektor mittels QIAquick PCR Purification Kit gereinigt und anschließend mit 30  $\mu$ l H<sub>2</sub>O eluiert. Bei der Dephosphorylierung wurde ein Aliquot aus 30  $\mu$ l gereinigtem Vektor, 5  $\mu$ l Dephosphorylationspuffer, 1 Unit alkalische Phosphatase und 14  $\mu$ l H<sub>2</sub>O für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Es folgte die erneute Reinigung des dephosphorylierten Vektors mittels QIAquick PCR Purification Kit und Eluieren mit 30  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Etwa 100 ng dephosphoryliertes p-Bluescriptvektor und 180 ng Insert wurden gemischt und mit 5 Units T<sub>4</sub>-DNA-Ligase, 0,1  $\mu$ mol ATP und 2  $\mu$ l Ligationspuffer über Nacht bei 16°C inkubiert.

### ***Transformation mit Plasmid-Insert-Komplex***

Zur Anzucht der *Escherichia coli*-Kulturen stellten wir zunächst eine Vorkultur aus 20 ml Luria-Bertani Medium (LB Medium) und 20  $\mu$ l *Escherichia coli* her, die bei 37°C über Nacht im Schüttler mit 250 rpm inkubiert wurden. Die Hauptkultur setzte sich aus einer Mischung aus 100  $\mu$ l Vorkultur und 20 ml LB Medium, die ebenfalls im Schüttler bei 250 rpm und 37°C für zwei Stunden inkubiert wurde. Die Hauptkultur wurde bei 4°C und 2500 rpm für 20 min zentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml



CaCl<sub>2</sub> gelöst und erneut bei 4 °C und 1500 rpm für 20 min abzentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet in 2 ml CaCl<sub>2</sub> gelöst und für 24 Stunden auf Eis aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden 100 µl der hergestellten kompetenten Wirtszellkultur 30 min auf Eis mit 20 µl Ligaseansatz sanft suspendiert. Zur Aufnahme der angelagerten Plasmide wurden die Zellen 90 sec bei 42 °C inkubiert und einige Minuten auf Eis gestellt. Zur Expression der Antibiotikaresistenzgene wurden sie in 200 µl LB Medium 45 min bei 37 °C inkubiert.

### ***Anzucht und Selektion***

LB Agar wurde autoklaviert und nach Zugabe von 60 µg/ml Ampicillin auf Petrischalen mit je 20 ml verteilt. Die abgekühlten Agarplatten wurden mit einem Gemisch aus 4,4 mg X-Gal und 0,4 mg IPTG gleichmäßig ausgestrichen. Nach 30 min konnte jeweils 100 µl der transformierten Zellkultur auf den Agarboden verstrichen werden. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden einzelne weiße Klone selektiert und in 5 ml LB Medium mit 6 µl Ampicillin über Nacht mit 250 rpm bei 37 °C geschüttelt.

Zur Isolation der rekombinanten Plasmid-DNA verwendeten wir das QIAprep Spin Miniprep Kit nach Herstellerprotokoll. Durch Restriktion mit XHO I und Hind III oder durch Fragmentlängenanalyse nach PCR-Amplifikation mit dem Primerpaar Intron 4-FW (markiert mit 5'-FAM) und Intron 4-RV wurden die Klone auf das Vorhandensein des Inserts hin durchsucht.

### **2.2.8 DNA-Sequenzierung**

Als letzte Untersuchung führten wir zur genauen Entschlüsselung des DNA-Codes der klonierten Intron 4-Allele die Sequenzierung nach der herkömmlichen Kettenabbruchmethode nach Sanger-Coulson (1977) durch. Die Technik ist eine spezielle PCR-Amplifikation mit anschließender elektrophoretischer Auftrennung. Die Unterschiede zur normalen PCR sind, dass man erstens nur einen Primer verwendet, um nur einen Strang der DNA-Matrize zu kopieren, und zweitens zusätzlich zu den üblichen Desoxynukleotiden (dNTPs) chemisch modifizierte und fluoreszenzmarkierte Nucleotide (DideoxynTPs = ddNTPs) einsetzt, die einen gewünschten Abbruch der Kette bewirken. Die Strangsynthese wird in Gang gesetzt, indem man die DNA-Polymerase und die vier dNTPs zusetzt. Außerdem fügt man



Im Anschluss wurden die Sequenzierungs-Proben mit einer Ethanol-fällung gereinigt. Die Proben wurden dann abzentrifugiert und das gewonnene Pellet in einer Vakuum-Zentrifuge 5 min getrocknet. Vollständig aufgelöst in 12 µl TSR-Puffer folgte die Denaturierung nach bekanntem Protokoll. Mit einem ABI Prism 310 Genetic Analyzer von Perkin Elmer (Weiterstadt) und Sequencing Analysis 3.4.1 Software führten wir die Sequenzierung zu Ende.

## 2.3 Labortechnische Geräte, Chemikalien, Puffer und Lösungen

### *Labortechnische Geräte*

---

Drucker	Deskjet 1600 CM, Hewlett-Packard Development Company, USA
Elektrophoresekammer	Owi Separation Systems, Portsmouth, Niederlande
Elektrophoresenetzgerät	Stabilisiertes Netzgerät 500V 0,5A, Firma Bachhofer, Deutschland
Inkubator-Schütteltruhe	Certomat® U, B. Braun Biotech International GmbH, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Laborwaage	Kern 824, Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Mikrowellengerät	HMT 702 C, Bosch Hausgeräte GmbH, München, Deutschland
PCR-Thermocycler	MJ Research PTC-200, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
pH-Meter	CG 840, Schott Geräte, Hofheim a. Ts, Deutschland
Rechner	Power Macintosh 7200/120, Apple, San Jose, USA
Sequenzierautomat	ABI Prism 310, Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland
Software	Sequencing Analysis 3.4.1 und Gene Scan Analysis 3.1.2, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Thermocycler	Trio Thermoblock, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Vakuumpzentrifuge	Firma von Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Videokamerasystem	Gel Print 2000i, BioPhotonics Corporation, Ann Arbor, USA
Vortex	VF2, Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Wasserbad	Julabo U3, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge	30 RF, Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland

## Chemikalien

---

Agarose	SeaKem LE Agarose®, BioProducts, Rockland, Maine, USA
Ampicillin sodium salt (50 mg/ml)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
ATP, lithium salt (100 mM)	Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland
Bacto®-tryptone	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto®-yeast-extract	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto® TM-agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bakterienstamm E.coli JM 101	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dephosphorylation Buffer (10x conc.)	Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland
5xDNA BlueRun™	Hybaid-AGS Heidelberg, Deutschland
PCR Nukleotid-Mix (dNTP's)	Finnzymes OY, Espoo, Finland
EDTA-Na <sup>2+</sup>	Titriplex®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 99%	Riedel-de Haen Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland
Ethanol	Riedel-de Haen Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland
Ethidium Bromid (aqueous sol. 1% w/v)	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, Deutschland
Formamid (CH <sub>3</sub> NO SigmaUltra®)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Hind III - Restriktionsenzym (20.000 U/ml)	New England Biolabs inc., Beverly, USA
Klonierungs- und Expressionvektor: pBluescript II AmpR lacZ mit MCS	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
Ligation Buffer (10x conc.)	Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) (25mM)	Hybaid-AGS Heidelberg, Deutschland
Methanol (Chromasolv ®)	Riedel-de Haen Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland
Natriumchlorid 0,9%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Acetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NE Buffer 2 (10x conc.)	New England Biolabs inc., Beverly, USA
NE Buffer 4 (10x conc.)	New England Biolabs inc., Beverly, USA

*(Fortsetzung Chemikalien)*

Phosphatase alkaline (1 U/μl)	Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Polymerase: Taq/Pwo Mix (2,5 units/μl)	Hybaid-AGS Heidelberg, Deutschland
Premix: Big Dye™ Terminator RRMix	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
QIAamp® DNA Mini Kit (250)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Reaction Buffer incomplete (10x)	Hybaid-AGS Heidelberg, Deutschland
Restriktionsenzym BstBI	New England Biolabs inc., Beverly, USA
DNA Molecular Weight Marker (0,25 μg/μl) XIV: 0,1-2,6 kbp VI: 0,15-2,1 kbp	Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland
Standard: Genescan® 2500 ROX Size Standard (8 nM)	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
T4 DNA Ligase (5 U/μl)	Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland
Trisbase (Trizma® Base)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Template Suppression Reagent (TSR)	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
UV-Safe-TAE® (50x)	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
X-gal (50 mg/ml)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
XHO I - Restriktionsenzym (20.000 U/ml)	New England Biolabs inc., Beverly, USA

## **Lösungen und Puffer**

---

TAE-Puffer (50x) (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)	242 g Trisbase + 57,1 ml Essigsäure (99%) + 100 ml EDTA-Na <sup>2+</sup> 0,5 M ad 1000 ml aqua dest. (pH : 7,6-7,8)
TAE-Puffer (5x)	10 µl TAE (50x) ad 300 µl aqua dest.
TAE-Puffer (1x)	20 ml TAE (50x) ad 1000 ml aqua dest.
UV-Safe-TAE (1x)	20 ml UV-Safe-TAE (50x) ad 1000 ml aqua dest.
Bluerun	100 µl Glycerin 50% + 100 µl Bromphenolblau 0,4% + 300 µl TAE-Lösung (5x)
Agarosegel 2%	1 g Agarose + 50ml TAE (1x)
LB-Medium (Luria Bertani)	10,0 g Bacto-tryptone + 5,0 g Bacto-yeast-extract + 10,0 g NaCl 0,9% ad 1000 ml aqua dest. (pH : 7,0. Einstellen mit ca. 3 ml NaOH 1M)
Agar	500 ml LB-Medium + 7,5 g Bacto-agar

## **2.4 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte für kontinuierliche Variablen anhand des Wilcoxon-Tests. Kategorische Variablen wurden mittels  $\chi^2$ -Test verglichen. Als statistisch signifikant wurden Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  angesehen.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Klinische Daten der Neugeborenen

Die klinischen Daten der untersuchten Neugeborenen wurden prospektiv erfasst und in **Tabelle 7** aufgeführt.

	Kontrollen	TTN-Gruppe	P
<b>Anzahl; <i>n</i></b>	83	74	
<b>Gestationsalter</b> ( <i>Median, Min-Max</i> )	39 (37-41) Wo	38 (37-41) Wo	0,085
<b>Geburtsgewicht</b> ( <i>Mittelwert <math>\pm</math> SD</i> )	3325 ( $\pm$ 541) g	3091 ( $\pm$ 435) g	0,006*
<b>hypotroph</b> (< 10. Perzentile); <i>n</i> (%)	7 (8,4%)	10 (13,5%)	0,441
<b>hypertroph</b> (> 90. Perzentile); <i>n</i> (%)	6 (7,2%)	3 (4,1%)	0,624
<b>Geschlechtsverteilung</b> ♀ : ♂	46 : 37	24 : 51	0,004*
<b>Geburtsmodus</b> Sectio ceasarea; <i>n</i> (%)	25 (30,1%)	52 (70,3%)	<0,001*
<b>Apgar-Score</b> <sub>5 min</sub> < 7; <i>n</i>	0	0	
<b>Arterieller Nabelschnur pH</b> < 7,10; <i>n</i>	0	0	

**Tabelle 7** : klinische Daten der Neugeborenen; \* signifikant

Kontroll- und TTN-Gruppe zeigten keinen statistischen Unterschied in der Verteilung des Gestationsalters. Apgar-Score <7 nach 5 Minuten und arterieller Nabelschnur pH < 7,10 wurden entsprechend der Ausschlusskriterien nicht registriert. In der TTN-Gruppe fanden sich im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant mehr männliche Neugeborene (68,9% vs 44,6%, p=0,004) und mit Sectio ceasarea entwickelte Neugeborene (70,3% vs 30,1%, p<0,001). Mit ihrem Geburtsgewicht lagen die TTN-Patienten signifikant niedriger als ihre Kontrollen (3091g vs 3325g, p=0,006). Der Anteil hypotropher Neugeborener mit intrauteriner Wachstumsretardierung (d.h. ein Geburtsgewicht unter der 10. Perzentile der Norm für das Gestationsalter, IUGR) oder hypertropher Kinder (über der 90. Perzentile) wies keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen auf.

Wir analysierten die Anteil der Patienten mit transienter Tachypnoe bezüglich Sauerstofftherapie (CPAP und Sauerstoffzufuhr über Maske) und Beatmung, antibiotische Prophylaxe und Komplikationen (Pneumothorax). Die Auswertung ergab, dass bei 54,1% der untersuchten TTN-Kinder (40/74) eine antibiotische Therapie durchgeführt wurde. Fast alle Patienten (73/74; 98,7%) zeigten einen Sauerstoffbedarf über Raumluft mit einer durchschnittlichen Dauer von 42,2(±)38,1 Stunden (Mittelwert(±)Standardabweichung). 24,3% der Neugeborenen (18/74) erhielten zudem eine CPAP-Atemhilfe. Eine Intubation und Beatmung war bei 9 von 74 Patienten (12,1%) erforderlich. Bei 2 Patienten komplizierte ein Pneumothorax den klinischen Verlauf. Hierbei zeigten Wildtypen und Träger eines varianten Intron 4-Allels keinen statistischen Unterschied in der Verteilung der untersuchten Variablen. Die Daten sind zur Übersicht differenziert in **Tabelle 8** aufgeführt. Die Kontrollen erhielten entsprechend der Einschlusskriterien als gesunde reife Neugeborenen keine Therapie.

	insgesamt (n=74)	Wildtyp (n=67)	Intron 4 - Polymorphismus (n=7)	P
<b>Antibiotische Therapie</b>				
- Anzahl, n (%)	40 (54,1%)	36 (53,7 %)	4 (57,1 %)	0,821
<b>Sauerstoffbedarf über Raumluft</b>				
- Anzahl, n (%)	73 (98,7 %)	66 (98,5 %)	7 (100 %)	0,165
<b>CPAP</b>				
- Anzahl, n (%)	18 (24,3 %)	16 (23,8 %)	2 (28,6 %)	0,856
<b>Beatmung</b>				
- Anzahl, n (%)	9 (12,1 %)	7 (10,4 %)	2 (28,6 %)	0,426
<b>Pneumothorax</b>				
- Anzahl, n (%)	2 (2,7 %)	2 (3 %)	0	0,449

**Tabelle 8:** Therapie- und Verlaufsübersicht aller TTN-Kinder differenziert nach Träger des Wildtyp-Allels und Intron 4-Polymorphismus; angegeben sind jeweils Anzahl n und prozentualer Anteil der Patienten.



### 3.2 Analyse der Intron 4-Sequenzen des SP-B Gens

Es wurde eine PCR zur Isolation und Amplifikation des SP-B Intron 4 Gens etabliert. Die Auftrennung dieser Intron 4-Produkte in der Gelelektrophorese detektierte 14 Neugeborene als heterozygot für ein variantes Intron 4-Allel. 11 dieser 14 Heterozygoten hatten ein kürzeres Allel und drei ein längeres Allel. Die restlichen 143 Kinder der Gesamtgruppe waren homozygot für den Wildtyp des SP-B Intron 4 Gens, dessen Länge 523 bp beträgt. Somit lag die Häufigkeit des Intron 4-Polymorphismus im gesamten Patientenkollektiv bei 8,7%.

Anhand der Fragmentlängenanalyse bestimmten wir die exakte Länge der varianten Allele. Außerdem konnten auch solche Allele identifiziert werden, die wegen ihres kleinen Längenunterschieds in der Gelelektrophorese nicht aufzutrennen waren. Es wurden insgesamt drei verschiedene variante Allele isoliert, deren Verteilung aus **Tabelle 9** zu ersehen ist.

Länge der varianten Allele	Anzahl der Neugeborenen
523 bp (Wildtyp)	143
523 bp + 245 bp	3
523 bp + 358 bp	8
523 bp + 570 bp	3

**Tabelle 9:** Verteilung der Intron 4-Allele in der untersuchten Gesamtpopulation

Vergleicht man die Häufigkeit der Intron 4-Variation zwischen der Kontrollgruppe (n=83) und TTN-Gruppe (n=74), so unterscheiden sie sich statistisch nicht (siehe **Tabelle 10**). 91,6% (76/83) der gesunden Kinder und 90,5% (67/74) der kranken Neugeborenen waren homozygote Träger für das Intron 4-Wildtyp-Gen. Ein signifikanter Unterschied konnte auch bei der Verteilung der Prävalenzen der varianten Allele zwischen den beiden Gruppen nicht nachgewiesen werden. Ferner zeigten beide Gruppen keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht ( $\chi^2$ -Test:  $p=0,70$  für die Kontrollen,  $p=0,64$  für die TTN-Gruppe).

Intron 4-Allel	Kontrollen (n=83)	TTN-Gruppe (n=74)	P
523 bp (Wildtyp)	76 (91,6%)	67 (90,5%)	0,969
245 bp	2	1	0,899
358 bp	3	5	0,622
570 bp	2	1	0,969

**Tabelle 10:** Verteilung der Intron 4-Allele innerhalb der Gruppen

Durch die Gensequenzierung wurde schließlich der genaue Aufbau des Intron 4-Polymorphismus bestimmt. Die Ergebnisse der Analyse von Insertion oder Deletion von Motiven bei den varianten Allelen ist in der folgenden **Tabelle 11** zusammengefasst.

Allele	Anordnung der Motive	Anzahl der Motive
523 bp (Wildtyp)	1;2;3;4;5;6;7;8;9;10;11	11
245 bp	1;10;11	3
358 bp	1;2;3;4;10;11	6
570 bp	1;1;2;3;4;5;6;7;8;9;10;11	12

**Tabelle 11:** Verteilung der Motive und Aufbau des identifizierten Polymorphismus

### 3.3 121ins2-Mutation

Bei keinem der Neugeborenen detektierten wir eine heterozygote 121ins2-Mutation im SP-B Exon 4-Gen. Ohne die Mutation lag für die Restriktion mit BstBI keine geeignete Schnittsequenz vor, sodass keine der von uns untersuchten PCR-Produkte in der Restriktionsreaktion geschnitten wurde.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Allgemeiner Teil

Die transiente Tachypnoe ist die häufigste Form der postnatalen Atemstörung reifer Neugeborener. Sie wurde erstmals vor fast 40 Jahren von Avery et al. beschrieben [Avery et al., 1966]. Bis heute ist die Pathogenese nicht eindeutig geklärt, sodass verschiedene Erklärungsmodelle existieren. Im Folgenden soll zunächst ein Überblick über die Vorgänge während der pulmonalen Adaptation mit ihrer Umstellung von der plazentaren auf die postnatale pulmonale Sauerstoffversorgung diskutiert und der Zusammenhang zwischen einer gestörten Adaptation und der Entstehung der TTN des Neugeborenen herausgearbeitet werden. Später wird dann auf die besondere Rolle von Surfactantprotein B in diesem Rahmen eingegangen.

#### 4.1.1 Resorption der fetalen Lungenflüssigkeit

Die Geburt stellt für das Neugeborene einen komplexen Anpassungsvorgang insbesondere des Herz-Kreislauf- und Lungensystems an das extrauterine Leben dar. Störungen dieser Adaptationsprozesse können über die Entstehung eines interstitiellen Lungenödems als erster Schritt an der Pathogenese der TTN beteiligt sein.

Zum Zeitpunkt der termingerechten Geburt ist die Lunge morphologisch reif und zum suffizienten Gasaustausch fähig. Die Lunge ist intrauterin ein flüssigkeitsgefüllter Organ, in der kein Gasaustausch stattfindet. Nach Durchtrennung der Nabelschnur erfordert die Umstellung vom plazentarem auf den pulmonalen Gasaustausch eine rasche Resorption der alveolären fetalen Lungenflüssigkeit und der Ersatz durch Atemgas. Die fetale alveoläre Flüssigkeit wird kontinuierlich vom Lungengewebe sezerniert. Analysen und Studien über die chemische Zusammensetzung von Amnion- und Alveolarflüssigkeit, Plasma und Lungenlymphe und elektrochemische Untersuchungen des Alveolarepithels führten zu den entscheidenden Kenntnissen über die Membraneigenschaft [Adamson et al., 1969]. Das gesunde Alveolarepithel stellt trotz seiner extremen Dünnwandigkeit für

Plasmabestandteile eine undurchlässige Barriere dar. Hingegen sind Kapillarwände gut durchgängig für Proteine und gelöste Substanzen. Auf diese Weise wird die für die Homöostase der Lungenflüssigkeit wichtige kolloidosmotische Druckdifferenz zwischen den beiden Kompartimenten (Alveole und Interstitium) aufrecht gehalten [Normand et al., 1971].

Die von Olver et al. 1974 erstmals nachgewiesene aktive Sekretion von Chlorid-Ionen in das Alveolarlumen stellt die treibende Kraft der Sekretion der fetalen Lungenflüssigkeit dar [Olver and Strang, 1974]. Die an der basolateralen Membran des Alveolarepithels gelegene Natrium-Kalium-ATPase baut den entscheidenden Gradienten für Natrium auf, der einen passiven gekoppelten Chlorid/Natrium-Einstrom und konsekutivem Wassereinstrom aus dem Interstitium in die Zelle zur Folge hat. Die intraluminale aktive Chlorid-Sekretion zieht das Wasser dem elektrochemischen Gradienten entsprechend weiter in die Alveolen [Ingbar et al., 1996; Olver et al., 1986].

Im Vordergrund des pulmonalen Adaptationsvorgangs steht die Umkehr der Flüssigkeitsdynamik der fetalen Lunge von der obigen Flüssigkeitsproduktion zu deren Resorption. Die fetale Lunge beginnt zwei bis drei Tage vor der Spontangeburt zunächst mit der Reduktion der Flüssigkeitssekretion und unmittelbar vor der Geburt mit der Resorption der fetalen Lungenflüssigkeit. Die Regulation und Mechanismen dieser komplexen Umstellung vom intrauterinen sekretorischen zum resorptiven Alveolarepithel vor und nach der Geburt ist nicht eindeutig geklärt. Jedoch scheinen sie an die hormonellen Änderungen gebunden zu sein, die in den letzten Tagen vor der Geburt und unter Wehentätigkeit auftreten. Mit Annäherung des natürlichen Geburtstermins und unter spontanen Wehen beobachtet man im fetalem Kreislauf einen deutlichen Konzentrationsanstieg der Katecholamine, dem eine entscheidende Rolle bei der Elimination der Alveolarflüssigkeit zugesprochen wird [Brown et al., 1983]. Walters und Olver et al. konnten zeigen, dass die Applikation von  $\beta$ -Adrenergika an fetalen Lämmern nicht nur zu einer Hemmung der Sekretion, sondern auch zu einer Resorption von fetaler Lungenflüssigkeit führte, wobei die unter konstanter Adrenalin-Gabe gemessene Resorptionsrate desto größer ausfiel, je näher die Feten dem Geburtstermin kamen. Dieser Effekt der Katecholamine auf die Flüssigkeitsverschiebung wird über  $\beta$ -Rezeptoren vermittelt, der durch die Gabe eines  $\beta$ -Rezeptorblockers (Propranolol) antagonisiert werden konnte [Walters and Olver, 1978].

Unter der Wirkung der Katecholamine kommt es zu einer Änderung der elektrochemischen Eigenschaften des Alveolarepithels. Die Eröffnung von großen Natrium-Kanälen (*epithelial sodium channel*, ENaC) auf der luminalen Seite des Alveolarepithels führt zu einer Natrium-Aufnahme in die Zelle. Über die Natrium-Kalium-ATPase wird das Natrium aktiv weiter ins Interstitium transportiert. Der Einstrom von Natrium aus dem Lumen in die Zelle verringert den Gradienten für Natrium über die Zellmembran und damit den Antrieb für den gekoppelten Chlorid/Natrium-Einstrom aus dem Interstitium in die Zelle. Das Resultat ist ein Netto-Fluss von Natrium-Ionen gegen den elektrochemischen Gradienten und die konsekutive passive Diffusion von Wasser aus dem Lumen in Richtung Interstitium bzw. Plasma - also eine Resorption von fetaler Alveolarflüssigkeit. Gestützt wird diese These durch die Beobachtung, dass die intraalveoläre Applikation von Amilorid, einem Natrium-Kanalblocker, den Effekt von Adrenalin auf den Natrium-Fluss und die Resorption von fetaler Lungenflüssigkeit aufhebt [Finley et al., 1998; Matalon et al., 1996; Matthay et al., 1996; O'Brodovich et al., 1990]. Untersuchungen an Schweinen zeigten, dass sowohl die Expression von  $\alpha$ ENaC-mRNA, als auch der hemmende Effekt von Amilorid und  $\beta$ -Rezeptorblockern auf die Resorption der fetalen Lungenflüssigkeit am stärksten in der Zeit kurz nach der Geburt ist und dass sie dann im Verlauf entsprechend der Katecholamin-Plasmakonzentration abfällt [Finley et al., 1998]. Die Rolle der epithelialen Natrium-Kanäle und des Natrium-Transports im Rahmen der perinatalen Flüssigkeitsresorption wurde in Tierexperimenten mit ENaC-genmanipulierten Mäusen (ENaC-knockout) weiter bestätigt. Das Fehlen der  $\alpha$ -Untereinheit führte im Gegensatz zum Fehlen der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit in genmanipulierten Mäusen zu einer letalen postnatalen Resorptionsstörung der alveolären Flüssigkeit. In den betroffenen  $\alpha$ ENaC-knockout Tieren konnte kein amilorid-sensitiver Natrium-Transport mehr festgestellt werden [Hummler et al., 1996]. Eine einfache Methode, die indirekt eine Aussage über die Ionen-Transportfähigkeit der Natrium-Kanäle des Lungenepithels zulässt, ist die Potentialdifferenzmessung am respiratorischem Epithel der oberen Atemwege in der Nase. So zeigten Neugeborene, die vor Eintreten der Wehen per Sectio caesarea entbunden wurden, und Neugeborene mit TTN eine höhere Potentialdifferenz mit reduzierter Amiloridantwort als spontangeborene Kinder [Gowen et al., 1988]. Die höchsten Werte wurden jedoch bei Frühgeborenen mit einem Atemnotsyndrom als Zeichen eines unzureichenden

und gestörten transepithelialen Natrium-Transports gemessen [Barker et al., 1997]. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an reifen Neugeborenen, konnte als Ursache der transitorischen Tachypnoe keine genetischen Veränderungen im Exon 12 und 13 Bereich kodierend für das Protein der „second transmembrane spanning domain“ des epithelialen Natrium-Kanals, dem aus proteinchemischer Sicht eine Schlüsselfunktion in der Ionenleitfähigkeit des Kanals zukommt, nachweisen [Landmann et al., 2005].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Umstellung des Alveolarepithels von der Sekretion in die Resorption von fetaler Flüssigkeit vor und nach der Geburt die Verminderung des Chlorid-Transports bei gleichzeitiger Etablierung eines aktiven Natrium-Transports mit der damit verbundenen Richtungsänderung des Flüssigkeitsstroms aus dem Lumen in das Interstitium von entscheidender Bedeutung ist und hierbei die Katecholaminreizung der  $\beta$ -Rezeptoren mit Aktivierung der Natrium-Kanäle einen wichtigen Regulationsmechanismus darstellt.

Darüber hinaus fördern Katecholamine die Bildung und Freisetzung von funktionellem Surfactant [McDonald et al., 1986; Rooney et al., 1977]. Die Wehentätigkeit wirkt sich auf diesen Vorgang begünstigend aus [Callen et al., 1979]. Die postnatale resorptive Eigenschaft des Alveolarepithels wird aber durch weitere Hormone und Faktoren mitreguliert und aufrecht gehalten. Tierexperimentelle Untersuchungen von Barker et al. demonstrierten, dass Schaffeten, deren Schilddrüse entfernt wurde, auf die Applikation von Katecholaminen nur bei gleichzeitiger Substitution mit Trijodthyronin und Glukokortikoiden die gewohnte Umstellung des Alveolarepithels auf die Flüssigkeitsresorption aufwiesen. Die getrennte Gabe der Hormone führte nicht zum oben genannten Effekt [Barker et al., 1988; Barker et al., 1990; Barker et al., 1991]. Mit Glukokortikoiden behandelte Alveolarzellkulturen zeigten eine gesteigerte Expression von  $\alpha$ ENaC-mRNA und Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase. Dieser Effekt konnte durch zusätzliches Trijodthyronin verstärkt werden [Norlin and Folkesson, 2001; Otulakowski et al., 1999; Champigny et al., 1994]. Des weiteren spielt Sauerstoff eine wichtige Funktion bei der Aufrechthaltung der resorptiven Membraneigenschaft nach der Geburt. Mit der postnatal einsetzenden Atmung steigt der alveoläre Sauerstoffpartialdruck. In Tierexperimenten von Barker et al. hemmte eine Erhöhung des

Sauerstoffpartialdrucks die Flüssigkeitssekretion in den explantierten Lungen von reifen oder in der Spätschwangerschaft entbundenen Mäusen. Hingegen zeigte eine in der Frühschwangerschaft entnommene unreife Lunge nur bei anschließender simultaner Behandlung mit Schilddrüsenhormonen und Steroiden eine ähnliche Sauerstoffwirkung [Barker and Gatzky, 1993]. Kulturen aus Alveolarzellen inkubiert mit einer der intrauterinen entsprechenden Sauerstoffkonzentration zeigten einen deutlich geringeren Natrium-Transportkapazität und  $\alpha\text{ENaC}$ -mRNA Expression als Kulturen unter Raumluftinkubation. Diese Beobachtungen machen nochmals deutlich, dass die Wirkung der Katecholamine und von Sauerstoff auf die peri- und postnatale resorptive Umstellung des Alveolarepithels entscheidend an die Anwesenheit von Glukokortikoiden und Schilddrüsenhormonen gebunden ist.

Die zwischen Alveolen, Interstitium, pulmonalen Gefäßen und Lymphsystem vorliegenden Druckverhältnisse und elektrochemischen Gradienten steuern postnatal den Flüssigkeitsstrom in der Lunge, um eine interstitielle oder alveoläre Wasserakkumulation zu verhindern. Treibende Kräfte für den Flüssigkeitsausstrom aus dem Lumen sind die Negativierung des hydrostatischen interstitiellen Druckes im Verhältnis zum intraalveolären Druck und die onkotische Druckdifferenz zwischen interstitieller Flüssigkeit und Alveolarflüssigkeit [Adamson et al., 1969; Howell et al., 1961]. Die Erhaltung dieser physiologischen Druckverhältnisse der einzelnen Lungenkompartimente ist zudem eng an das Vorhandensein einer ausreichenden Konzentration von funktionellem Surfactant an der alveolären Grenzschicht gebunden. Die Oberflächenspannung baut an den Alveolen einen Unterdruck auf, der Flüssigkeit aus den Blutkapillaren in das Interstitium zieht. Die antiödematöse Wirkung von Surfactant beruht auf der Reduktion der Oberflächenspannung und somit des Druckgradienten.

Unter der Wirkung von Surfactant entfalten sich bereits in utero die Alveolen und die während des ersten Atemzugs mit hohem transpulmonalem Druck eindringende Atemluft drängt die Flüssigkeit aus dem Lumen der Alveolen in das Interstitium. Die Belüftung der Lunge senkt den hydrostatischen Druck in den Blutkapillaren und erhöht die Lungendurchblutung, wodurch die effektive Resorptionsfläche steigt. Erst 30 bis 60 Minuten postnatal nimmt der Wassergehalt ab. Nur ein kleiner Teil der fetalen Lungenflüssigkeit wird während des Durchtritts durch den Geburtskanal über die Atemwege ausgepresst, während der restliche Anteil aus den Luftwegen in das Lungeninterstitium um die großen Gefäße und

Bronchien abgeleitet und von dort über Lymphgefäße und größtenteils über die Kapillaren drainiert wird. Bis alle Alveolen belüftet und fetale Lungenflüssigkeit aus ihnen resorbiert ist, vergehen 1 bis 3 Stunden und erst nach 6 Stunden postnatal ist das Wasser aus dem Lungeninterstitium über die genannten Drainagewege vollständig abtransportiert [Brown et al., 1983; Bland et al., 1982].

Diese pathogenetischen Mechanismen, die zu einer verzögerten fetalen Flüssigkeitsresorption und damit zu einer TTN führen, können durch Störungen der Kreislaufumstellung im Rahmen der postnatalen Adaptation verstärkt werden. So kann ein persistierender Ductus arteriosus (PDA) über den bestehenden Links-Rechts-Shunt zu einer erhöhten Lungendurchblutung und zusätzlichen Flüssigkeitsüberladung des Lungengewebes führen [Jacob et al., 1980]. Auch ein persistierender fetaler Kreislauf mit einem großen Rechts-Links-Shunt über den PDA und Foramen ovale und postnatal bestehender pulmonaler Hypertension führt zu einer vermehrten Flüssigkeitsbelastung und Ödembildung im Interstitium und Alveole [Raj and Bland, 1986].

#### **4.1.2 Rolle des SP-B im Rahmen der postnatalen pulmonalen Adaptation**

Einige Autoren machen einen Mangel an Surfactant oder ein unreifes Surfactantsystem als Ursache der TTN verantwortlich [Skelton and Jeffery, 1994; James et al., 1984; Callen et al., 1979]. Eine Lungenunreife, gemessen am reduziertem Lecithin-Sphingomyelin-Verhältnis und Phosphatidylglycerolmenge im Trachealsekretaspirat von reifen Neugeborenen im Vergleich zu gesunden Kontrollen, wurde auch in anderen Studien als ätiologischer Faktor der TTN postuliert [Gross et al., 1983; James et al., 1984]. Surfactant setzt sich vorwiegend aus Proteinen und Lipiden zusammen. Die Phospholipide machen den größten Anteil des Surfactants aus und sind für die oberflächenaktive Eigenschaft verantwortlich. Es stabilisiert die Alveolen vor dem endexpiratorischem Kollaps durch Reduktion ihrer Oberflächenspannung nach dem LaPlace'schen Gesetz. Besonders in der kritischen Zeitspanne unmittelbar nach der Geburt wird eine rasche und vollständige Belüftung der Alveolen mit den ersten Atemzügen durch die Wirkung von Surfactant und schnelle Phospholipidanreicherung der Grenzschicht gewährleistet. Die Surfactant-assoziierten Proteine spielen bei der Formierung und Erhaltung dieser Wasser-Luft-Phasengrenze eine dominierende Rolle. Zahlreiche Untersuchungen an



Tiermodellen sowie klinische Beobachtungen zur Funktion des SP-B zeigen seine wichtige Rolle im Prozess der neonatalen pulmonalen Adaptation. Unter den Surfactant-assoziierten Proteinen gilt das SP-B als einziges für die postnatale Lungenfunktion und das weitere Überleben des Neugeborenen als unentbehrlich.

Akute und chronische Lungenleiden werden mit einer Reihe von Mutationen im SP-B kodierenden Gen assoziiert, wobei die Mehrzahl dieser Genveränderungen nur sporadisch in einigen Familien mit akuten Lungenversagen der homozygoten Neugeborenen nachgewiesen werden konnten [Tredano et al., 2003]. Bislang sind etwa 75 solcher Kinder mit akutem Lungenversagen bei einer angeborenen SP-B Mangel berichtet worden [Nogee, 2004]. Ein kompletter Mangel an SP-B durch homozygote Deletion im SP-B Gen demonstriert in experimentellen Studien mit genmanipulierten SP-B(-/-) Mäusen und Neugeborenen mit kongenitaler Alveolarproteinose infolge SP-B Mangel seinen wichtigen Einfluss auf die Lungenfunktion und die fundamentale Rolle für die pulmonale Adaptation.

Nogee et al. identifizierten erstmals bei drei reifen Neugeborenen einer Familie eine Mutation im SP-B Gen, die als homozygote Träger der Mutation postnatal trotz Surfactant-Substitutionstherapie an einem schweren Lungenversagen verstarben [Nogee et al., 1993; Nogee et al., 1994]. In der aktuellen Literatur werden mehr als 25 autosomal-rezessive Mutationen oder Einzelnukleotid-Polymorphismen im SP-B Gen berichtet, die bei homozygoten Neugeborenen klinisch mit einem akuten Lungenversagen oder einer chronischen interstitiellen Lungenerkrankung imponieren können [Nogee et al., 2000; Cole et al., 2001]. Die meisten dieser Kinder manifestieren ein fortschreitendes Lungenversagen innerhalb der ersten 48 Lebensstunden und versterben unter maximaler Therapie mit Gabe von exogenem Surfactant innerhalb von 3 Monaten [Hamvas et al., 1995]. Die Untersuchungsergebnisse der Lungenfunktion und radiologische Befunde entsprachen denen eines Surfactant-Mangels. Die am häufigsten beschriebene Mutation im SP-B Gen ist die Insertion von zwei Basenpaaren im Kodon 121 mit konsekutiver Verschiebung des Leserasters (121ins2) als SP-B Synthesestörung. Die Häufigkeit des Allels wird bislang zwischen 0,3 bis 1 unter 1000 Individuen geschätzt [Cole et al., 2000]. Homozygote Träger dieser Mutation leiden an einer Form der neonatalen alveolären Proteinose. Hingegen zeigen heterozygote Genotypen eine physiologische postnatale pulmonale Adaptation. Schwere neonatale Lungenerkrankungen in reifen Neugeborenen entwickelten sich bei

Missense-, Nonsense-, Punkt- und Splice-Mutation sowie bei Insertion oder Deletion von Basen im SP-B Gen [Nogee et al., 2000;Weaver and Conkright, 2001]. Einige Genvariationen führen zur Bildung eines abnormalen SP-B, das mit immunhistologischen Methoden im Lungengewebe nachzuweisen ist, andere wiederum zum absoluten SP-B Mangel, d.h. weder im Lungengewebe noch im Lavagematerial betroffener Kinder konnte SP-B detektiert werden. Charakteristisch für diese Mutationen ist die Prozessierung und Nachweis eines aberranten SP-C Präkursorproteins, das die Diagnose des hereditären absoluten SP-B Mangels erleichtert [Vorbroker et al., 1995]. Andere seltenere Mutationen stehen in Assoziation zu milden akuten oder chronischen interstitiellen Lungenerkrankung in der Kindheit als Folge eines partiellen SP-B Mangels, dass nur kleine Mengen oder nur unzureichendes funktionelles SP-B produziert wird. Klinisch benötigen die betroffenen Kinder intermittierend zusätzlichen Sauerstoffzufuhr. Es ist jedoch unklar, ob die hier zu beobachtenden lungenhistologischen Veränderungen mit intrazellulärer Akkumulation von aberranten Surfactantproteinen, atypischen Makrophagen, Epithelzelldysplasien und Lungenfibrose das Resultat der chronisch veränderten Oberflächenspannung und Atelektasen sind oder durch die Wirkung des abnormen SP-B und anderer Proteine induziert sind [Dunbar et al., 2000;Klein et al., 1998;Ballard et al., 1995;Whitsett and Weaver, 2002]. Auch ein vorübergehender SP-B Mangel mit klinischer Manifestation eines akuten Atemnotsyndroms wird in der Literatur berichtet. Die respiratorische Situation eines Neugeborenen verbesserte sich bei gleichzeitig vermehrt nachweisbarem SP-B in der alveolären Lavage. Die molekulargenetische Untersuchung zeigte eine Heterozygotie mit einem normalem Allel im SP-B Gen und einem variantem Allel, das für die transiente SP-B Synthesestörung verantwortlich war [Klein et al., 1998]. Diese Beobachtungen und weitere genetische und biochemische Analysen an Neugeborenen, die auf einem Allel Träger der 121ins2-Mutation und auf dem anderen einer anderen SP-B Mutation waren, heterozygoten Erwachsenen und genmanipulierten Mausmodellen lassen vermuten, dass für die ungestörte pulmonale Adaptation eine unklare kritische Menge an funktionellem SP-B notwendig ist. Man schätzt, dass eine ca. 25-50% normale SP-B Produktion für die normale postnatale Lungenfunktion benötigt wird [Melton et al., 2003;Clark et al., 1995;Akinbi et al., 1997;Clark et al., 1997]. Inwieweit dies unter anderen Stressbedingungen wie z.B. ARDS gilt, ist nicht geklärt. In Mausmodellen zeigte sich jedoch, dass unter Belastungssituation wie Hyperoxie die

121ins2-Heterozygotie durch die reduzierte SP-B Synthese zur chronischen Lungenveränderung führt [Tokieda et al., 1999]. Entsprechend bei heterozygoten Individuen sind jedoch keine Erkrankungen oder Störungen bis heute festgestellt worden [Yusen et al., 1999]. Im Rahmen der neonatalen pulmonalen Anpassungsvorgangs spielen die biophysikalischen Eigenschaften des SP-B eine wichtige Funktion. Mischungen aus SP-B und Phospholipiden haben vergleichbare biophysikalische Eigenschaften wie das komplette Surfactant. Vor allem durch seine Fähigkeit, die Adsorptionsrate um einen Faktor größer 150 zu erhöhen, beschleunigt das mature SP-B die Bildung einer an der Wasser-Luft-Grenzfläche liegenden und aus Phospholipiden bestehenden oberflächenaktiven Schicht [Griese, 1999]. Die extrazelluläre Form von Surfactant ist das tubuläre Myelin, an deren Bildung SP-B ebenfalls unverzichtbar beteiligt ist [deMello et al., 1994b; Williams et al., 1991]. Das tubuläre Myelin gilt als Präkursorfraktion des oberflächenaktiven Surfactant [Hawgood, 1989].

Der komplette SP-B Mangel durch homozygote Mutationen im SP-B Gen mit dem schweren postnatalen respiratorischen Versagen ist eine sehr seltene Erkrankung der Neugeborenenperiode. Viel häufiger ist das Auftreten eines Atemnotsyndroms Frühgeborener (RDS) als Ausdruck des Surfactant-Mangels und die transiente Tachypnoe Reifgeborener bedingt durch die verzögerte fetale Flüssigkeitsresorption. Zahlreiche Studien in amerikanischen und finnischen Kollektiven konnten eine Modifikation für das Entstehungsrisiko eines RDS in Abhängigkeit von Polymorphismen im SP-B Gen bzw. in Kombination zum SP-A Gen darstellen [Hallman and Haataja, 2003; Floros and Fan, 2001; Makri et al. 2002].

## **4.2 Spezieller Teil**

### **4.2.1 Methodik**

Durch die Auswahl unseres Patientenkollektivs sollten akute neonatale Atemnotsyndrome und andere diskutierte Auslöser der Atemstörung klar ausgeschlossen werden. Die untersuchten Neugeborenen zeigten bis auf die erforderlichen klinischen und radiologischen Kriterien der TTN keine weiteren kardiopulmonalen Erkrankungen oder Fehlbildungen, keine Infektion und Asphyxie. Neugeborene von diabetischen Mütter wurden ebenfalls nicht in die Studie

aufgenommen. Da die Verteilung der varianten SP-B Intron 4-Allelen sich innerhalb verschiedener ethnischer Gruppen unterscheidet [Veletza et al., 1996], rekrutierten wir unsere Patienten ausschließlich aus einer homogenen kaukasischen Population.

Die für die Untersuchung benötigte genomische DNA isolierten wir aus Vollblut, welches entweder als EDTA-Blut in gewöhnlichen Röhrchen gesammelt oder als Trockenblut auf Filterpapier abgenommen wurde. In der Pädiatrie wird die Entnahme von Blut auf Filterpapier in Rahmen des Neugeborenen Screenings auf Stoffwechseldefekte standardmäßig durchgeführt. Zu Beginn der 60er verwendete Dr. Robert Guthrie als erster Filterpapierblut zur Detektion von Phenylalanin bei Neugeborenen im Rahmen des Neugeborenen Screenings auf die Phenylketonurie [Guthrie and Susi, 1963]. Die Proben können für das Neugeborene weniger invasiv kapillär auf Filterpapier entnommen, sicher und kostengünstig zur weiteren Bearbeitung versendet werden. Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass sich Trockenblut für Genanalysen ohne jegliche Beeinträchtigung eignet. Erst seit ungefähr 15 Jahren wird die Filterkartenmethode in Rahmen von epidemiologischen Studien angewandt [Mei et al., 2001; McCabe, 1991]. Die Durchführung der DNA-Isolierung und erhaltene Menge und Qualität an DNA aus Filterpapier unterschied sich in unserer Arbeit kaum von der aus EDTA-Blut und war vollkommen ausreichend für die weiteren molekularbiologischen Messungen. Ein anderer und wichtiger Vorteil des Filterpapiers gegenüber den Röhrchen ist die sehr platzsparende Lagerungsmöglichkeit bei Raumluft. EDTA-Röhrchen müssen aufwendig in Gefrierschränken bei minus 80 °C gelagert werden. Dem Pädiater steht mit den Filterkarten eine komfortable und leicht zugängliche DNA-Quelle zur Verfügung, denn die notwendige Blutentnahme kann mit der routinemäßigen Blutabnahme im Rahmen der Screeninguntersuchung kombiniert werden.

Nach molekularbiologischen Standardmethoden und mit kommerziellen Kits führten wir die anschließenden Messungen durch. Im weiteren amplifizierten wir aus der isolierten DNA die gewünschten Abschnitte im SP-B Gen. Die verwendeten Primer, PCR-Ansätze und -Programme für die Fragmentlängenanalyse, Restriktionsverdau, Klonierung und Sequenzierung waren bereits in unserem Labor etabliert und wurden nach Standardmethoden durchgeführt (vgl. Makri et al. 2002).

## 4.2.2 Bewertung der Ergebnisse

### ***121ins2-Mutation***

Die am häufigsten gefundene Ursache für den hereditären kompletten Surfactantprotein B Mangel ist wie zuvor erwähnt die homozygote 121ins2-Mutation. Mit unserer Untersuchung bezüglich einer heterozygoten 121ins2-Mutation bei den Neugeborenen, die eine postnatale Atemstörung hatten, konnten wir keine Assoziation mit der Inzidenz der transienten Tachypnoe zeigen. Keines der untersuchten Kinder war Träger dieser Mutation.

### ***Intron 4-Längenpolymorphismen***

Die Bedeutung verschiedener Intron 4-Variationen auf die Lungenfunktion und insbesondere auf die postnatale Adaptation könnte auf eine mögliche regulatorische Wirkung des Polymorphismus auf die Transkriptions- und Translationsrate des SP-B Gens zurückzuführen sein, sodass zum Zeitpunkt der postnatalen Adaptation, wo die oberflächenaktive Funktion des SP-B besonders beansprucht wird, SP-B in unzureichender Menge vorliegt. Da der Intron 4-Polymorphismus im Gegensatz zur 121ins2-Mutation nur einen nicht kodierenden Abschnitt im SP-B Gen betrifft, ist eventuell ein quantitativer und nicht qualitativer Unterschied in der SP-B Expression als eines der möglichen Mechanismen anzunehmen. Verschiedene Längenvariationen und Dinukleotid-Wiederholungen innerhalb von Introns vermögen die Transkriptionsaktivität des zugehörigen Gens in unterschiedlicher Weise zu beeinflussen [Akai et al., 1999; Gebhardt et al., 1999; Pravica et al., 1999]. Eine weitere Möglichkeit könnte eine verminderte Proteinsynthese und verminderter SP-B Speicher in den Typ II-Alveolarzellen oder auch eine veränderte Raumstruktur des SP-B Moleküls mit Beeinträchtigung seiner Funktion in Folge von durch diese Genvariationen entstandenen Splice-Varianten sein. Lin et al. zeigten, dass eine neue SP-B mRNA Splice-Variante sich in geringen Mengen in gesunden Menschen, bei Patienten mit Lungenerkrankungen aber vermehrt zu finden ist [Lin et al., 1999].

Die Auswertung der eigenen Daten von insgesamt 157 Neugeborenen zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung der Häufigkeit der Intron 4-Polymorphismen zwischen Kontrollen und TTN-Gruppe. Ca. 90% der Individuen beider Gruppen waren homozygote Träger des Wildtyp-Allels. Im Gegensatz zu den Daten von Makri et al. 2002 aus unserer Arbeitsgruppe und Floros et al. 1995, die bei

17,2% und 16,8% der gesunden Neugeborenen eine Intron 4-Längenvariante feststellten, waren nur ca. 10% der von uns untersuchten Neugeborene beider Gruppen heterozygote Träger für den SP-B Intron 4-Polymorphismus. Die Häufigkeit für den Intron 4-Wildtyp lag bei Haataja et al. unter 475 gesunden Reifgeborenen ebenfalls bei 90% [Haataja et al., 2000]. Jedoch überwogen auch bei uns die kürzeren Allele, wobei wir nicht alle Intron 4-Allele, die von Makri et al. beschrieben wurde, in unserem Kollektiv nachweisen konnten. Die Prävalenz der Intron 4-Allele unterschieden sich nicht in den untersuchten Gruppen. Die Sequenzierungsergebnisse der bei uns festgestellten Intron 4-Varianten bestätigen die Daten von Makri et al. und Haataja et al. dahingehend, dass das 10. Motiv nur aus einem einzelnen Nukleotid Guanin (im Gegensatz zu den Daten von Floros et al. aus GAG) besteht und dass kürzere Allele auch aus der Deletion und Insertion von Motiven und längere Varianten durch Wiederholung von einer Anzahl von Motiven und nicht, wie 1995 von Floros beschrieben, nur aus Insertion degenerierter Motive entstehen.

### ***Risikofaktoren der TTN und eigene Daten***

Wie bereits zuvor erwähnt, beeinflusst die Katecholaminausschüttung bei der Geburt und unter Wehen entscheidend die perinatale Flüssigkeitsresorption und die Inzidenz der TTN. Je ausgeprägter und länger die Wehen sind, desto höhere Katecholaminspiegel werden im Plasma beobachtet [Faxelius et al., 1983]. Untersuchungen an Tieren zeigten, dass die frühe Geburt per Sectio caesarea, insbesondere wenn dies vor Einsetzen der Wehen geschieht (primäre Sectio), die postnatale Flüssigkeitsresorption verzögert. Es ist bekannt, dass Neugeborene nach primärer Sectio eine höhere Inzidenz für pulmonale Störungen zeigen als solche nach Spontangeburt oder sekundärer Sectio, d.h. nach Einsetzen der Wehen [Bland et al., 1982; Faxelius et al., 1982; Bland, 1983; Bland et al., 1979; Patel et al., 1983; Bland et al., 1989; Morrison et al., 1995; Sundell et al., 1980]. Auch finden sich bei TTN-Kindern niedrigere Noradrenalinwerte im Plasma als Neugeborene nach einer Spontangeburt [Greenough and Lagercrantz, 1992]. Unsere Ergebnisse mit einer signifikant höheren Sectiohäufigkeit bei den Neugeborenen mit TTN als bei der gesunden Kontrollgruppe bestätigen diese Beobachtungen.

Neben der Geburtsform, -zeitpunkt und Gestationsalter begünstigen auch männliches Geschlecht, Geburtsgewicht, perinatale Faktoren wie Asphyxie und

mütterliche Erkrankungen wie Diabetes und Asthma die Entstehung des Krankheitsbildes der TTN [Dani et al., 1999]. Diese Faktoren beeinflussen über verschiedene Mechanismen die fetale Flüssigkeitsresorption. Mit der Frühgeburtlichkeit geht eine Unreife aller Systeme der Lunge einher, sodass die postnatale respiratorische Adaptation durch verschiedene Faktoren und insbesondere durch Surfactantmangel beeinträchtigt wird. Auch fanden sich in unreifen Neugeborenen nach primärer Sectio aus wehenfreiem Uterus reduzierte Noradrenalin Spiegel [Greenough and Lagercrantz, 1992]. Wir definierten durch unsere Studienkriterien nur reife Neugeborene mit einem Gestationsalter größer 37 Wochen als Untersuchungskollektiv, um die Rolle der Frühgeburtlichkeit als potentiellen Einflussfaktor für die TTN in den vorliegenden Untersuchungen auszuschließen. Sowohl TTN- als auch die Kontrollgruppe unterschieden sich nicht in ihrem mittleren Gestationsalter von 38 Wochen. Die Lungenparenchymentwicklung zeigt auch eine Abhängigkeit vom intrauterinem fetalem Wachstum, dass das Geburtsgewicht ein Risikofaktor für postnatale respiratorische Störungen darstellt. In Übereinstimmung mit den Daten von Dani et al. hatten die von uns untersuchten TTN-Neugeborene ein signifikant niedrigeres Geburtsgewicht im Vergleich zu ihren Kontrollen, wobei der Anteil intrauterin wachstumsretardierter Neugeborener sich in beiden Gruppen statistisch nicht unterschied. Ebenfalls konnten wir mit unseren Daten nicht bestätigen, dass Makrosomie die Entwicklung der TTN fördert, wie zuvor von Rawlings et al. publiziert. Die Gruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Anteils hypertropher Neugeborener.

Eine Asphyxie führt infolge der metabolischen Azidose zu einem Kapillarleck mit Austritt von Plasmaproteinen in die Alveolen und zum anderen zu einer Erhöhung des Lungengefäßwiderstands mit einem Linksherzversagen und verzögerten Flüssigkeitsresorption mit interstitiellem/alveolärem Ödem. Zudem ist die Freisetzung sowie Wirkung der Katecholamine bei asphyktischen Neugeborenen reduziert [Tudehope and Smyth, 1979]. Keines der von uns untersuchten Neugeborene war entsprechend der Ausschlusskriterien asphyktisch.

In einer Studie zwischen 1978 und 1984 bei ca. 600 asthmatischen und gesunden Müttern trat bei Vorliegen von Asthma signifikant häufiger eine TTN bei den Neugeborenen auf als bei Neugeborenen der gesunden Kontrollmütter [Schatz et al., 1991]. Auch andere Studien bestätigen diese Assoziation zwischen erhöhter

TTN-Inzidenz und maternalem Asthma [Schatz, 1999; Demissie et al., 1998]. Man vermutet, dass Mütter mit Asthmaleiden und deren Neugeborene eine genetische Prädisposition für eine reduzierte Antwort ihrer  $\beta$ -Rezeptoren auf Katecholamine haben [Barnes, 1986]. Diese Hypothese wird unterstützt von den Ergebnissen der Studie, dass solche Kinder, bei denen in der Neugeborenenperiode eine TTN diagnostiziert wurde, im Alter von 4 bis 5 Jahren auch vermehrt zu obstruktiven und asthmaähnlichen Atemproblemen neigen [Shohat et al., 1989]. In dem von uns untersuchten Studienkollektiv fand sich nur eine Mutter mit einem bekannten Asthmaleiden, sodass wir diesen möglichen Risikofaktor anhand unserer Ergebnisse nicht diskutieren können.

Ein weiterer Faktor, der die intrauterine Lungenentwicklung und folglich die postnatale pulmonale Adaptation mitbestimmt, ist das Geschlecht. Tiermodelle demonstrierten eine geschlechtsspezifische fetale Lungenentwicklung mit einer verzögerten Reifung der Lunge und Surfactantsynthese bei männlichen Tieren [Adamson and King, 1984a; Adamson and King, 1984b]. Andere Untersuchungen zeigten, dass das Androgen über die Beeinflussung von Wachstumsfaktoren die Reifung des Surfactantsystems verzögert und so das Risiko für eine postnatale Atemstörung erhöht [Dammann et al., 2000; Torday et al., 1981; Nielsen, 1992; Miller and Futrakul, 1968]. Zudem konnte in Mausmodellen demonstriert werden, dass weibliche Geschlechtshormone ähnlich wie Glukokortikoide über die Regulation der Genexpression und Funktion von ENaC die fetale Flüssigkeitsresorption fördern. In den Lungen von ausgewachsenen weiblichen Tieren fanden sich höhere  $\alpha$ ENaC-mRNA-Werte als in männlichen Mäusen. Eine simultane Applikation von Progesteron und  $17\beta$ -Estradiol steigerte die mRNA-Expression für  $\alpha$  und  $\gamma$ ENaC. Auch die Inkubation der Zellkulturen mit obigen Hormonen führte zu einer dosisabhängigen amilorid-sensitiven gesteigerten ENaC-Aktivität [Sweezey et al., 1998]. Unsere TTN-Gruppe weist wie bei Rawlings et al. einen signifikant höheren Anteil männlicher Neugeborene als im Vergleich zu ihren gesunden Kontrollen [Rawlings and Smith, 1984].

Ein Diabetes mellitus Typ I oder II während der Schwangerschaft bzw. Gestationsdiabetes führt ebenfalls zu einer Unreife der Lunge und des Surfactantsystems mit folglich erhöhtem TTN-Risiko [Hanson and Persson, 1993]. Diese TTN-Inzidenz wird durch die erhöhte Sectionhäufigkeit und Frühgeburtslichkeit bei diabetischen Müttern mitbeeinflusst und muss bei der Risikoanalyse letztendlich



berücksichtigen werden [Morrison et al., 1995]. In der Amnionflüssigkeit von diabetischen Müttern sind die Konzentration der Surfactant-assoziierten Proteine vermindert und das Phospholipidprofil verändert [Nogee et al., 1988]. In Tiermodellen ließ sich demonstrieren, dass Insulin die kortisoninduzierte Phosphatidylcholinsynthese in den Pneumozyten Typ II durch möglicherweise Inhibierung der Wachstumsfaktorproduktion hemmt [Carlson et al., 1984]. Hohe Glukosespiegel beeinträchtigen zudem die Phosphatidylcholinbildung (Lecithin) [Gewolb et al., 1993]. In unserer vorliegenden Arbeit wurden alle Mütter mit Diabetes mellitus oder Gestationsdiabetes ausgeschlossen, damit die TTN-Inzidenz in der Summe der strengen Ausschlusskriterien weitgehend auf die noch nicht geklärte SF-B Mutationen hin untersucht und assoziiert werden können.

Die TTN ist charakterisiert durch ihren benignen Verlauf. Meistens benötigen die betroffenen Kinder den Sauerstoffbedarf über Raumluft innerhalb der ersten 2 bis 3 Lebenstage. In der Arbeit von Tudehope et al. klangen bei 74% der Neugeborene die Symptome innerhalb der ersten 48 Stunden ab [Tudehope and Smyth, 1979]. Aber auch prolongierte Verlaufsformen mit einem Sauerstoffbedarf von bis zu 8 Tagen sind bekannt [Brice and Walker, 1977; Stahlman, 1977]. Diese TTN-Kinder waren oft männlich, ihr Geburtstermin lag knapp über der Grenze der von Frühgeborenen, waren per Sectio cesarea geboren und zeigten milde Asphyxiezeichen. Meine Daten entsprechen mit obigen Ergebnissen dahingehend, dass die durchschnittliche Krankheitsdauer mit zusätzlichen Sauerstoffbedarf bei ungefähr 42 Stunden mit einer Streubreite von 38 Stunden liegt. Ca. 18% der TTN-Neugeborene benötigten aufgrund ihrer ausgeprägten Atemstörung mehr als 3 Tage (höchstens 5 Tage) eine Sauerstofftherapie, wobei verhältnismäßig viele dieser Kinder mit dem prolongiertem Verlauf beatmet waren (4 von insgesamt 9 beatmeten Neugeborenen). Eine Assoziation des Krankheitsverlaufs mit den untersuchten Genmutationen, Geschlecht, Geburtsgewicht, Sectio cesarea, Apgar-Score und Nabelschnur-pH oder mütterlichen Daten konnten wir hingegen nicht feststellen.

Zusammenfassend decken sich unsere Resultate der klinischen Daten der Neugeborenen mit den Beobachtungen bereits vorher publizierter Risikofaktoren wie männliches Geschlecht, niedriges Geburtsgewicht und Sectio cesarea. Auch konnten wir zeigen, dass die TTN durch eine benigne Verlaufsform gekennzeichnet ist. Es lässt sich feststellen, dass nach den Ergebnissen unserer Studie keine

Assoziation zwischen SP-B Intron 4-Polymorphismen und der transienten Tachypnoe vorliegt. Auch eine heterozygote 121ins2-Mutation im Exon 4 des SP-B Gens konnte bei keinem der untersuchten Neugeborenen gefunden werden. Die Ätiologie der transienten Tachypnoe bleibt weiterhin noch zu klären. Ähnliche Studien über andere seltenere Mutationen im SP-B Gen, im ENaC-System oder im  $\beta$ -Adrenorezeptorensystem sollten als mögliche genetische Prädispositionsfaktoren weiter untersucht werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die transiente Tachypnoe ist in der Regel eine selbstlimitierende Störung der pulmonalen Adaptation in der unmittelbaren neonatalen Periode des reifen Neugeborenen als Folge einer verzögerten Resorption der fetalen Lungenflüssigkeit. Unter den vier Surfactant-assoziierten Proteinen ist das lipophile SP-B das wichtigste Element des Surfactantsystems für die postnatale pulmonale Adaptation. Homozygote Träger der häufigsten Genvariation des SP-B Gens, der 121ins2-Mutation, versterben aufgrund des SP-B Mangels als Neugeborene an einer Form der kongenitalen alveolären Proteinose. Studien konnten zeigen, dass Polymorphismen im Intron 4 des SP-B zum Risiko und Verlauf des Atemnotsyndroms des Frühgeborenen assoziiert sind.

Ziel unserer Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen genetischen Variationen des SP-B (heterozygote 121ins2-Mutation oder Polymorphismen im Intron 4) und der TTN zu untersuchen. Desweiteren sollte die Verteilung und der Aufbau der gefundenen Intron 4-Polymorphismen bestimmt werden und schließlich bereits publizierte Risikofaktoren der TTN anhand der eigenen klinischen Daten kritisch überprüft werden.

Unser Patientenkollektiv erfasste 74 reife Neugeborene mit TTN und 83 gesunde als Kontrollgruppe. Neugeborene mit Infektionen, angeborenen kardialen oder pulmonalen Fehlbildungen, Asphyxie und Kinder diabetischer Mütter wurden ausgeschlossen. Zur Identifizierung der Intron 4-Polymorphismen und der heterozygoten 121ins2-Mutation aus EDTA-Blut oder Blutfilterkärtchen wurden PCR, Fragmentlängenanalysen und Gensequenzierungen durchgeführt.

Beide Gruppen zeigten keinen statistischen Unterschied in der Verteilung des Gestationsalters (38 SSW vs. 39 SSW), Apgar-Score <7 nach 5 Minuten (beide 0%) und Nabelschnur pH < 7,10 (beide 0%). In der TTN-Gruppe war der Anteil an männlichen Neugeborenen (68,9% vs. 44,6%,  $p=0,004$ ) und mit Sectio caesarea entwickelten Neugeborenen (70,3% vs. 30,1%,  $p<0,001$ ) signifikant höher. Das Geburtsgewicht der Neugeborenen mit TTN war im Vergleich zu ihren Kontrollen signifikant niedriger (3091g vs. 3325g,  $p=0,006$ ). Der Anteil intrauterin wachstumsretardierter oder makrosomer Neugeborener zeigten keinen signifikanten Unterschied. Bei keinem der untersuchten Patienten fand sich die 121ins2-Mutation.

Die Häufigkeit der Intron 4-Polymorphismen unterschied sich nicht zwischen erkrankten Kindern und der Kontrollgruppe (9,5% vs. 8,4%).

Wir konnten bereits etablierte Risikofaktoren der TTN, wie männliches Geschlecht, niedriges Geburtsgewicht und Entwicklung per Sectio caesarea, bestätigen. Intron 4-Polymorphismen und 121ins2-Mutation in den untersuchten Genabschnitten erklären nicht das Krankheitsbild der TTN. Weitere Untersuchungen sind zur Klärung der Ätiologie der transitorischen Tachypnoe notwendig.

### **Summary: Transient tachypnea of the newborn (TTN): A role for polymorphisms of surfactant protein B (SP-B) encoding gene?**

TTN is usually a benign self-limiting respiratory disorder in the immediate neonatal period. The lipophilic surfactant-associated protein B (SP-B) was demonstrated to be the most relevant structural component of the surfactant system for immediate postnatal pulmonary adaptation. Homozygous 121ins2 mutation of the SP-B encoding gene results in SP-B deficiency and fatal neonatal respiratory failure. Furthermore polymorphisms within the intron 4 of the SP-B gene were shown to be related to the risk and course of respiratory distress syndrome.

We therefore aimed at investigating whether genetic variations of SP-B (heterozygous 121ins2 mutation or intron 4 polymorphisms) may be associated with TTN. An other goal of our research was to determine the distribution and structure of identified intron 4 polymorphisms. At least own clinical data will be discussed with previous published risk factors of the TTN.

In order to identify SP-B heterozygous 121ins2 mutation and intron 4 polymorphisms, we analyzed genomic DNA by means of PCR amplification, fragment length and sequence analysis in 74 term neonates presenting with TTN and 83 healthy term infants as controls. Newborns with any infection, pulmonary or cardiac congenital malformations, postnatal asphyxia and infants born to diabetic mothers were excluded.

Both groups showed no statistical difference in gestational age (39 weeks vs. 38 weeks), Apgar-score at 5 minutes < 7 (0% each) and umbilical artery pH < 7.10 (0% each). The frequency of male infants (68.9% vs. 44.6%,  $p=0.004$ ) and neonates

born via caesarean section (70.3% vs. 30.1%,  $p < 0.001$ ) were significantly higher in TTN group. The TTN newborns showed a significantly lower birth weight than their controls (3091g vs. 3325g,  $p = 0.006$ ). There was no statistical difference in the frequency of newborns with IUGR or makrosomia between both groups. None of the neonates were heterozygous for the 121ins2 SP-B mutation. The frequency of intron 4 variations did not differ between TTN newborns and healthy controls (9.5% vs. 8.4%).

Our data suggest male gender, low birth weight and caesarean section to be risk factors for TTN which is in accordance with previous studies. We conclude polymorphisms of intron 4 and heterozygous 121ins2 mutation not to associated with TTN. Further investigation is needed to understand underlying mechanisms of TTN .

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Adamson IY, King GM (1984a) Sex differences in development of fetal rat lung. I. Autoradiographic and biochemical studies. *Lab Invest* 50: 456-60
- Adamson IY, King GM (1984b) Sex differences in development of fetal rat lung. II. Quantitative morphology of epithelial-mesenchymal interactions. *Lab Invest* 50: 461-8
- Adamson TM, Boyd RD, Platt HS, Strang LB (1969) Composition of alveolar liquid in the foetal lamb. *J Physiol* 204: 159-68
- Akai J, Kimura A, Hata RI (1999) Transcriptional regulation of the human type I collagen alpha2 (COL1A2) gene by the combination of two dinucleotide repeats. *Gene* 239: 65-73
- Akinbi HT, Breslin JS, Ikegami M, Iwamoto HS, Clark JC, Whitsett JA, Jobe AH, Weaver TE (1997) Rescue of SP-B knockout mice with a truncated SP-B proprotein. Function of the C-terminal propeptide. *J Biol Chem* 272: 9640-7
- Amirkhanian JD, Bruni R, Waring AJ, Navar C, Taeusch HW (1993) Full length synthetic surfactant proteins, SP-B and SP-C, reduce surfactant inactivation by serum. *Biochim Biophys Acta* 1168: 315-20
- Augusto L, Le Blay K, Auger G, Blanot D, Chaby R (2001) Interaction of bacterial lipopolysaccharide with mouse surfactant protein C inserted into lipid vesicles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L776-85
- Avery ME, Gatewood OB, Brumley G (1966) Transient tachypnea of newborn. Possible delayed resorption of fluid at birth. *Am J Dis Child* 111: 380-5
- Ballard PL, Noguee LM, Beers MF, Ballard RA, Planer BC, Polk L, deMello DE, Moxley MA, Longmore WJ (1995) Partial deficiency of surfactant protein B in an infant with chronic lung disease. *Pediatrics* 96: 1046-52
- Barker PM, Brown MJ, Ramsden CA, Strang LB, Walters DV (1988) The effect of thyroidectomy in the fetal sheep on lung liquid reabsorption induced by adrenaline or cyclic AMP. *J Physiol* 407: 373-83
- Barker PM, Gatzky JT (1993) Effect of gas composition on liquid secretion by explants of distal lung of fetal rat in submersion culture. *Am J Physiol* 265: L512-7
- Barker PM, Gowen CW, Lawson EE, Knowles MR (1997) Decreased sodium ion absorption across nasal epithelium of very premature infants with respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 130: 373-7
- Barker PM, Markiewicz M, Parker KA, Walters DV, Strang LB (1990) Synergistic action of triiodothyronine and hydrocortisone on epinephrine-induced reabsorption of fetal lung liquid. *Pediatr Res* 27: 588-91
- Barker PM, Walters DV, Markiewicz M, Strang LB (1991) Development of the lung liquid reabsorptive mechanism in fetal sheep: synergism of triiodothyronine and hydrocortisone. *J Physiol* 433: 435-49
- Barnes PJ (1986) Endogenous catecholamines and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 77: 791-5
- Beers MF, Hamvas A, Moxley MA, Gonzales LW, Guttentag SH, Solarin KO, Longmore WJ, Noguee LM, Ballard PL (2000) Pulmonary surfactant metabolism in infants lacking surfactant protein B. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22: 380-91
- Benne CA, Kraaijeveld CA, van Strijp JA, Brouwer E, Harmsen M, Verhoef J, van Golde LM, van Iwaarden JF (1995) Interactions of surfactant protein A with influenza A viruses: binding and neutralization. *J Infect Dis* 171: 335-41
- Bland RD (1983) Dynamics of pulmonary water before and after birth. *Acta Paediatr Scand Suppl* 305: 12-20
- Bland RD, Bressack MA, McMillan DD (1979) Labor decreases the lung water content of newborn rabbits. *Am J Obstet Gynecol* 135: 364-7

- Bland RD, Carlton DP, Scheerer RG, Cummings JJ, Chapman DL (1989) Lung fluid balance in lambs before and after premature birth. *J Clin Invest* 84: 568-76
- Bland RD, Hansen TN, Haberkern CM, Bressack MA, Hazinski TA, Raj JU, Goldberg RB (1982) Lung fluid balance in lambs before and after birth. *J Appl Physiol* 53: 992-1004
- Bonafe L, Rubaltelli FF (1996) The incidence of acute neonatal respiratory disorders in Padova county: an epidemiological survey. *Acta Paediatr* 85: 1236-40
- Botas C, Poulain F, Akiyama J, Brown C, Allen L, Goerke J, Clements J, Carlson E, Gillespie AM, Epstein C, Hawgood S (1998) Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11869-74
- Brice JE, Walker CH (1977) Changing pattern of respiratory distress in newborn. *Lancet* 2: 752-4
- Bridges JP, Wert SE, Noguee LM, Weaver TE (2003) Expression of a human surfactant protein C mutation associated with interstitial lung disease disrupts lung development in transgenic mice. *J Biol Chem* 278: 52739-46
- Brown MJ, Olver RE, Ramsden CA, Strang LB, Walters DV (1983) Effects of adrenaline and of spontaneous labour on the secretion and absorption of lung liquid in the fetal lamb. *J Physiol* 344: 137-52
- Bucciarelli RL, Egan EA, Gessner IH, Eitzman DV (1976) Persistence of fetal cardiopulmonary circulation: one manifestation of transient tachypnea of the newborn. *Pediatrics* 58: 192-7
- Callen P, Goldsworthy S, Graves L, Harvey D, Mellows H, Parkinson C (1979) Mode of delivery and the lecithin/sphingomyelin ratio. *Br J Obstet Gynaecol* 86: 965-8
- Carlson KS, Smith BT, Post M (1984) Insulin acts on the fibroblast to inhibit glucocorticoid stimulation of lung maturation. *J Appl Physiol* 57: 1577-9
- Champigny G, Voilley N, Lingueglia E, Friend V, Barbry P, Lazdunski M (1994) Regulation of expression of the lung amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channel by steroid hormones. *EMBO J* 13: 2177-81
- Clark JC, Weaver TE, Iwamoto HS, Ikegami M, Jobe AH, Hull WM, Whitsett JA (1997) Decreased lung compliance and air trapping in heterozygous SP-B- deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16: 46-52
- Clark JC, Wert SE, Bachurski CJ, Stahlman MT, Stripp BR, Weaver TE, Whitsett JA (1995) Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7794-8
- Clements JA (1957) Surface tension of lung extracts. *Proc Soc Exp Biol Med* 95: 170-2
- Clements JA (1977) Functions of the alveolar lining. *Am Rev Respir Dis* 115: 67-71
- Cole FS, Hamvas A, Noguee LM (2001) Genetic disorders of neonatal respiratory function. *Pediatr Res* 50: 157-62
- Cole FS, Hamvas A, Rubinstein P, King E, Trusgnich M, Noguee LM, deMello DE, Colten HR (2000) Population-based estimates of surfactant protein B deficiency. *Pediatrics* 105: 538-41
- Creuwels LA, van Golde LM, Haagsman HP (1997) The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. *Lung* 175: 1-39
- Curstedt T, Johansson J, Barros-Soderling J, Robertson B, Nilsson G, Westberg M, Jornvall H (1988) Low-molecular-mass surfactant protein type 1. The primary structure of a hydrophobic 8-kDa polypeptide with eight half-cystine residues. *Eur J Biochem* 172: 521-5
- Dammann CE, Ramadurai SM, McCants DD, Pham LD, Nielsen HC (2000) Androgen regulation of signaling pathways in late fetal mouse lung development. *Endocrinology* 141: 2923-9

- Dani C, Reali MF, Bertini G, Wiechmann L, Spagnolo A, Tangucci M, Rubaltelli FF (1999) Risk factors for the development of respiratory distress syndrome and transient tachypnoea in newborn infants. Italian Group of Neonatal Pneumology. *Eur Respir J* 14: 155-9
- deMello DE, Heyman S, Phelps DS, Hamvas A, Nogee L, Cole S, Colten HR (1994a) Ultrastructure of lung in surfactant protein B deficiency. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 230-9
- deMello DE, Nogee LM, Heyman S, Krous HF, Hussain M, Merritt TA, Hsueh W, Haas JE, Heidelberger K, Schumacher R, et al (1994b) Molecular and phenotypic variability in the congenital alveolar proteinosis syndrome associated with inherited surfactant protein B deficiency. *J Pediatr* 125: 43-50
- Demissie K, Marcella SW, Breckenridge MB, Rhoads GG (1998) Maternal asthma and transient tachypnea of the newborn. *Pediatrics* 102: 84-90
- Dobbs LG, Pian MS, Maglio M, Dumars S, Allen L (1997) Maintenance of the differentiated type II cell phenotype by culture with an apical air surface. *Am J Physiol* 273: L347-54
- Dunbar AE 3rd, Wert SE, Ikegami M, Whitsett JA, Hamvas A, White FV, Piedboeuf B, Jobin C, Guttentag S, Nogee LM (2000) Prolonged survival in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency associated with a novel splicing mutation. *Pediatr Res* 48: 275-82
- Emrie PA, Jones C, Hofmann T, Fisher JH (1988) The coding sequence for the human 18,000-dalton hydrophobic pulmonary surfactant protein is located on chromosome 2 and identifies a restriction fragment length polymorphism. *Somat Cell Mol Genet* 14: 105-10
- Epaud R, Ikegami M, Whitsett JA, Jobe AH, Weaver TE, Akinbi HT (2003) Surfactant protein B inhibits endotoxin-induced lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 373-8
- Faxelius G, Bremme K, Lagercrantz H (1982) An old problem revisited--hyaline membrane disease and Cesarean section. *Eur J Pediatr* 139: 121-4
- Faxelius G, Hagnevik K, Lagercrantz H, Lundell B, Irestedt L (1983) Catecholamine surge and lung function after delivery. *Arch Dis Child* 58: 262-6
- Finley N, Norlin A, Baines DL, Folkesson HG (1998) Alveolar epithelial fluid clearance is mediated by endogenous catecholamines at birth in guinea pigs. *J Clin Invest* 101: 972-81
- Fisher AB, Chander A, Reichert J (1987a) Uptake and degradation of natural surfactant by isolated rat granular pneumocytes. *Am J Physiol* 253: C792-6
- Fisher JH, Kao FT, Jones C, White RT, Benson BJ, Mason RJ (1987b) The coding sequence for the 32,000-dalton pulmonary surfactant-associated protein A is located on chromosome 10 and identifies two separate restriction-fragment-length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 40: 503-11
- Fisher JH, Shannon JM, Hofmann T, Mason RJ (1989) Nucleotide and deduced amino acid sequence of the hydrophobic surfactant protein SP-C from rat: expression in alveolar type II cells and homology with SP-C from other species. *Biochim Biophys Acta* 995: 225-30
- Floros J, Fan R (2001) Surfactant protein A and B genetic variants and respiratory distress syndrome: allele interactions. *Biol Neonate* 80 Suppl 1: 22-5
- Floros J, Lin Z (1999) Genetic variability of surfactant protein-B and respiratory distress syndrome: clinical implications. *Medscape Respiratory Care* 3(2)
- Floros J, Lin HM, Garcia A, Salazar MA, Guo X, DiAngelo S, Montano M, Luo J, Pardo A, Selman M (2000) Surfactant protein genetic marker alleles identify a subgroup of tuberculosis in a Mexican population. *J Infect Dis* 182: 1473-1478
- Floros J, Veletzka SV, Kotikalapudi P, Krizkova L, Karinch AM, Friedman C, Buchter S, Marks K (1995) Dinucleotide repeats in the human surfactant protein-B gene and respiratory-distress syndrome. *Biochem J* 305 ( Pt 2): 583-90



- Gebhardt F, Zanker KS, Brandt B (1999) Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J Biol Chem* 274: 13176-80
- Gewolb IH, Unger ME, Merdian W, Deutsch J, Cavalieri RL (1993) High glucose causes delayed fetal lung maturation as measured by fluorescence anisotropy. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 794-800
- Glasser SW, Burhans MS, Korfhagen TR, Na CL, Sly PD, Ross GF, Ikegami M, Whitsett JA (2001) Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6366-71
- Glasser SW, Korfhagen TR, Weaver T, Pilot-Matias T, Fox JL, Whitsett JA (1987) cDNA and deduced amino acid sequence of human pulmonary surfactant-associated proteolipid SPL(Phe). *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 4007-11
- Gortner L, Hilgendorff A (2004) Surfactant-associated proteins B and C: molecular biology and physiologic properties. *Z Geburtshilfe Neonatol* 208: 91-7
- Gowen CW Jr, Lawson EE, Gingras J, Boucher RC, Gatzky JT, Knowles MR (1988) Electrical potential difference and ion transport across nasal epithelium of term neonates: correlation with mode of delivery, transient tachypnea of the newborn, and respiratory rate. *J Pediatr* 113: 121-7
- Greenough A, Lagercrantz H (1992) Catecholamine abnormalities in transient tachypnoea of the premature newborn. *J Perinat Med* 20: 223-6
- Griese M (1999) Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J* 13: 1455-76
- Gross TL, Sokol RJ, Kwong MS, Wilson M, Kuhnert PM (1983) Transient tachypnea of the newborn: the relationship to preterm delivery and significant neonatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol* 146: 236-41
- Guthrie R, Susi A (1963) A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 32: 338-43
- Haagsman HP, Diemel RV (2001) Surfactant-associated proteins: functions and structural variation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 129: 91-108
- Haagsman HP, van Golde LM (1991) Synthesis and assembly of lung surfactant. *Annu Rev Physiol* 53: 441-64
- Haataja R, Ramet M, Marttila R, Hallman M (2000) Surfactant proteins A and B as interactive genetic determinants of neonatal respiratory distress syndrome. *Hum Mol Genet* 9: 2751-60
- Halliday HL, McClure G, Reid MM (1981) Transient tachypnoea of the newborn: two distinct clinical entities? *Arch Dis Child* 56: 322-5
- Hallman M, Feldman BH, Kirkpatrick E, Gluck L (1977) Absence of phosphatidylglycerol (PG) in respiratory distress syndrome in the newborn. Study of the minor surfactant phospholipids in newborns. *Pediatr Res* 11: 714-20
- Hallman M, Haataja R (2003) Genetic influences and neonatal lung disease. *Semin Neonatol* 8: 19-27
- Hamvas A, Cole FS, deMello DE, Moxley M, Whitsett JA, Colten HR, Nogee LM (1994) Surfactant protein B deficiency: antenatal diagnosis and prospective treatment with surfactant replacement. *J Pediatr* 125: 356-61
- Hamvas A, Nogee LM, deMello DE, Cole FS (1995) Pathophysiology and treatment of surfactant protein-B deficiency. *Biol Neonate* 67 Suppl 1: 18-31
- Hamvas A, Nogee LM, Mallory GB Jr, Spray TL, Huddleston CB, August A, Dehner LP, deMello DE, Moxley M, Nelson R, Cole FS, Colten HR (1997) Lung transplantation for treatment of infants with surfactant protein B deficiency. *J Pediatr* 130: 231-9

- Hamvas A, Nogee LM, White FV, Schuler P, Hackett BP, Huddleston CB, Mendeloff EN, Hsu FF, Wert SE, Gonzales LW, Beers MF, Ballard PL (2004) Progressive lung disease and surfactant dysfunction with a deletion in surfactant protein C gene. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 771-6
- Hanson U, Persson B (1993) Outcome of pregnancies complicated by type 1 insulin-dependent diabetes in Sweden: acute pregnancy complications, neonatal mortality and morbidity. *Am J Perinatol* 10: 330-3
- Hawgood S (1989) Pulmonary surfactant apoproteins: a review of protein and genomic structure. *Am J Physiol* 257: L13-22
- Heidinger K, König I.R, Bohnert A, Kleinsteinber A, Hilgendorff A, Gortner L, Ziegler A, Chakraborty T, Bein G (2005) Polymorphisms in the human surfactant protein-D (SFTPD) gene: strong evidence that serum levels of surfactant protein-D (SP-D) are genetically influenced. *Immunogenetics* 2005 Feb 8 (Epub ahead of print)
- Hilgendorff A, Rawer D, Doerner M, Tutdibi E, Ebsen M, Schmidt R, Guenther A, Gortner L, Reiss I (2003) Synthetic and natural surfactant differentially modulate inflammation after meconium aspiration. *Intensive Care Med* 29: 2247-54
- Howell JB, Permutt S, Proctor DF, Riley RL (1961) Effect of inflation of the lung on different parts of pulmonary vascular bed. *J Appl Physiol* 16: 71-6
- Hummler E, Barker P, Gatzky J, Beermann F, Verdumo C, Schmidt A, Boucher R, Rossier BC (1996) Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat Genet* 12: 325-8
- Hummler E, Horisberger JD (1999) Genetic disorders of membrane transport. V. The epithelial sodium channel and its implication in human diseases. *Am J Physiol* 276: G567-71
- Ikegami M, Korfhagen TR, Bruno MD, Whitsett JA, Jobe AH (1997) Surfactant metabolism in surfactant protein A-deficient mice. *Am J Physiol* 272: L479-85
- Ikegami M, Korfhagen TR, Whitsett JA, Bruno MD, Wert SE, Wada K, Jobe AH (1998) Characteristics of surfactant from SP-A-deficient mice. *Am J Physiol* 275: L247-54
- Ingbar DH, Weeks CB, Gilmore-Hebert M, Jacobsen E, Duvick S, Dowin R, Savik SK, Jamieson JD (1996) Developmental regulation of Na, K-ATPase in rat lung. *Am J Physiol* 270: L619-29
- Jacob J, Gluck L, DiSessa T, Edwards D, Kulovich M, Kurlinski J, Merritt TA, Friedman WF (1980) The contribution of PDA in the neonate with severe RDS. *J Pediatr* 96: 79-87
- James DK, Chiswick ML, Harkes A, Williams M, Hallworth J (1984) Non-specificity of surfactant deficiency in neonatal respiratory disorders. *Br Med J (Clin Res Ed)* 288: 1635-8
- Johansson J, Curstedt T, Robertson B (1994) The proteins of the surfactant system. *Eur Respir J* 7: 372-91
- King RJ, Klass DJ, Gikas EG, Clements JA (1973) Isolation of apoproteins from canine surface active material. *Am J Physiol* 224: 788-95
- Klaus MH, Clements JA (1961) Composition of surface-active material isolated from beef lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 47: 1858-9
- Klein JM, Thompson MW, Snyder JM, George TN, Whitsett JA, Bell EF, McCray PB Jr, Nogee LM (1998) Transient surfactant protein B deficiency in a term infant with severe respiratory failure. *J Pediatr* 132: 244-8
- Korfhagen TR, Bruno MD, Ross GF, Huelsman KM, Ikegami M, Jobe AH, Wert SE, Stripp BR, Morris RE, Glasser SW, Bachurski CJ, Iwamoto HS, Whitsett JA (1996) Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9594-9
- Korimilli A, Gonzales LW, Guttentag SH (2000) Intracellular localization of processing events in human surfactant protein B biosynthesis. *J Biol Chem* 275: 8672-9

- Kuroki Y, Shiratori M, Murata Y, Akino T (1991) Surfactant protein D (SP-D) counteracts the inhibitory effect of surfactant protein A (SP-A) on phospholipid secretion by alveolar type II cells. Interaction of native SP-D with SP-A. *Biochem J* 279 ( Pt 1): 115-9
- Lahti M, Lofgren J, Marttila R, Renko M, Klaavuniemi T, Haataja R, Ramet M, Hallmann M (2002) Surfactant protein D gene polymorphisms associated with severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Res* 51: 696-699
- Landmann E., Schmittpott M., Tutdibi E., Gortner L. (2005) Is transient tachypnoea of the newborn associated with polymorphisms in the epithelial sodium channel encoding gene? Investigation of the second transmembrane spanning domain of the alpha-subunit. *Acta Paediatr* 94 ( in press)
- LeVine AM, Elliott J, Whitsett JA, Srikiatkachorn A, Crouch E, DeSilva N, Korfhagen T (2004) Surfactant protein-d enhances phagocytosis and pulmonary clearance of respiratory syncytial virus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 193-9
- LeVine AM, Whitsett JA, Gwozdz JA, Richardson TR, Fisher JH, Burhans MS, Korfhagen TR (2000) Distinct effects of surfactant protein A or D deficiency during bacterial infection on the lung. *J Immunol* 165: 3934-40
- LeVine AM, Whitsett JA, Hartshorn KL, Crouch EC, Korfhagen TR (2001) Surfactant protein D enhances clearance of influenza A virus from the lung in vivo. *J Immunol* 167: 5868-73
- Lin S, Akinbi HT, Breslin JS, Weaver TE (1996) Structural requirements for targeting of surfactant protein B (SP-B) to secretory granules in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 271: 19689-95
- Lin S, Na CL, Akinbi HT, Apsley KS, Whitsett JA, Weaver TE (1999) Surfactant protein B (SP-B)  $-/-$  mice are rescued by restoration of SP-B expression in alveolar type II cells but not Clara cells. *J Biol Chem* 274: 19168-74
- Lin S, Phillips KS, Wilder MR, Weaver TE (1996) Structural requirements for intracellular transport of pulmonary surfactant protein B (SP-B). *Biochim Biophys Acta* 1312: 177-85
- Lin Z, Wang G, Demello DE, Floros J (1999) An alternatively spliced surfactant protein B mRNA in normal human lung: disease implication. *Biochem J* 343 Pt 1: 145-9
- Makri V, Hospes B, Stoll-Becker S, Borkhardt A, Gortner L (2002) Polymorphisms of surfactant protein B encoding gene: modifiers of the course of neonatal respiratory distress syndrome? *Eur J Pediatr* 161: 604-8
- Malhotra R, Haurum J, Thiel S, Sim RB (1992) Interaction of C1q receptor with lung surfactant protein A. *Eur J Immunol* 22: 1437-45
- Manroe BL, Weinberg AG, Rosenfeld CR, Browne R (1979) The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells. *J Pediatr* 95: 89-98
- Matalon S, Benos DJ, Jackson RM (1996) Biophysical and molecular properties of amiloride-inhibitable Na<sup>+</sup> channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 271: L1-22
- Matthay MA, Folkesson HG, Verkman AS (1996) Salt and water transport across alveolar and distal airway epithelia in the adult lung. *Am J Physiol* 270: L487-503
- McCabe ER (1991) Utility of PCR for DNA analysis from dried blood spots on filter paper blotters. *PCR Methods Appl* 1: 99-106
- McCormack FX (1998) Structure, processing and properties of surfactant protein A. *Biochim Biophys Acta* 1408: 109-31
- McDonald JV Jr, Gonzales LW, Ballard PL, Pitha J, Roberts JM (1986) Lung beta-adrenoreceptor blockade affects perinatal surfactant release but not lung water. *J Appl Physiol* 60: 1727-33
- Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH (2001) Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J Nutr* 131: 1631S-6S

- Melton KR, Nesselin LL, Ikegami M, Tichelaar JW, Clark JC, Whitsett JA, Weaver TE (2003) SP-B deficiency causes respiratory failure in adult mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*
- Miller HC, Futrakul P (1968) Birth weight, gestational age, and sex as determining factors in the incidence of respiratory distress syndrome of prematurely born infants. *J Pediatr* 72: 628-35
- Miller LK, Calenoff L, Boehm JJ, Riedy MJ (1980) Respiratory distress in the newborn. *JAMA* 243: 1176-9
- Morrison JJ, Rennie JM, Milton PJ (1995) Neonatal respiratory morbidity and mode of delivery at term: influence of timing of elective caesarean section. *Br J Obstet Gynaecol* 102: 101-6
- Möller, J. Surfactanttherapie des respiratorischen Versagens bei Kindern und Erwachsenen. 1. Auflage, Uni-Med Verlag Bremen. 2002
- Nag K, Munro JG, Hearn SA, Rasmussen J, Petersen NO, Possmayer F (1999) Correlated atomic force and transmission electron microscopy of nanotubular structures in pulmonary surfactant. *J Struct Biol* 126: 1-15
- Nepomuceno RR, Henschen-Edman AH, Burgess WH, Tenner AJ (1997) cDNA cloning and primary structure analysis of C1qR(P), the human C1q/MBL/SPA receptor that mediates enhanced phagocytosis in vitro. *Immunity* 6: 119-29
- Nielsen HC (1992) Testosterone regulation of sex differences in fetal lung development. *Proc Soc Exp Biol Med* 199: 446-52
- Nogee L, McMahon M, Whitsett JA (1988) Hyaline membrane disease and surfactant protein, SAP-35, in diabetes in pregnancy. *Am J Perinatol* 5: 374-7
- Nogee LM (1998) Genetics of the hydrophobic surfactant proteins. *Biochim Biophys Acta* 1408: 323-33
- Nogee LM (2004) Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease. *Annu Rev Physiol* 66: 601-23
- Nogee LM, de Mello DE, Dehner LP, Colten HR (1993) Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 328: 406-10
- Nogee LM, Dunbar AE 3rd, Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA (2001) A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N Engl J Med* 344: 573-9
- Nogee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, deMello DE, Colten HR (1994) A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin Invest* 93: 1860-3
- Nogee LM, Wert SE, Proffitt SA, Hull WM, Whitsett JA (2000) Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 973-81
- Norlin A, Folkesson HG (2001) Alveolar fluid clearance in late-gestational guinea pigs after labor induction: mechanisms and regulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L606-16
- Normand IC, Olver RE, Reynolds EO, Strang LB (1971) Permeability of lung capillaries and alveoli to non-electrolytes in the foetal lamb. *J Physiol* 219: 303-30
- O'Brodovich H, Hannam V, Seear M, Mullen JB (1990) Amiloride impairs lung water clearance in newborn guinea pigs. *J Appl Physiol* 68: 1758-62
- O'Brodovich HM (1996) Immature epithelial Na<sup>+</sup> channel expression is one of the pathogenetic mechanisms leading to human neonatal respiratory distress syndrome. *Proc Assoc Am Physicians* 108: 345-55
- Olver RE, Ramsden CA, Strang LB, Walters DV (1986) The role of amiloride-blockable sodium transport in adrenaline-induced lung liquid reabsorption in the fetal lamb. *J Physiol* 376: 321-40

- Olver RE, Strang LB (1974) Ion fluxes across the pulmonary epithelium and the secretion of lung liquid in the foetal lamb. *J Physiol* 241: 327-57
- Otulakowski G, Rafii B, Bremner HR, O'Brodovich H (1999) Structure and hormone responsiveness of the gene encoding the alpha-subunit of the rat amiloride-sensitive epithelial sodium channel. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 1028-40
- Pasula R, Wright JR, Kachel DL, Martin WJ 2nd (1999) Surfactant protein A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* 103: 483-90
- Patel DM, Donovan EF, Keenan WJ (1983) Transient respiratory difficulty following cesarian delivery. *Biol Neonate* 43: 146-51
- Perez-Gil J, Keough KM (1998) Interfacial properties of surfactant proteins. *Biochim Biophys Acta* 1408: 203-17
- Phelps DS, Floros J (1988) Localization of surfactant protein synthesis in human lung by in situ hybridization. *Am Rev Respir Dis* 137: 939-42
- Pichel JG, Fernandez-Moreno C, Vicario-Abejon C, Testillano PS, Patterson PH, de Pablo F (2003) Developmental cooperation of leukemia inhibitory factor and insulin-like growth factor I in mice is tissue-specific and essential for lung maturation involving the transcription factors Sp3 and TTF-1. *Mech Dev* 120: 349-61
- Pilot-Matias TJ, Kister SE, Fox JL, Kropp K, Glasser SW, Whitsett JA (1989) Structure and organization of the gene encoding human pulmonary surfactant proteolipid SP-B. *DNA* 8: 75-86
- Pinto RA, Hawgood S, Clements JA, Benson BJ, Naidu A, Hamilton RL, Wright JR (1995) Association of surfactant protein C with isolated alveolar type II cells. *Biochim Biophys Acta* 1255: 16-22
- Pinto RA, Wright JR, Lesikar D, Benson BJ, Clements JA (1993) Uptake of pulmonary surfactant protein C into adult rat lung lamellar bodies. *J Appl Physiol* 74: 1005-11
- Pison U, Max M, Neuendank A, Weissbach S, Pietschmann S (1994) Host defence capacities of pulmonary surfactant: evidence for 'non-surfactant' functions of the surfactant system. *Eur J Clin Invest* 24: 586-99
- Pitkanen O (2001) Lung epithelial ion transport in neonatal lung disease. *Biol Neonate* 80 Suppl 1: 14-7
- Possmayer F (1988) A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am Rev Respir Dis* 138: 990-8
- Poulain FR, Akiyama J, Allen L, Brown C, Chang R, Goerke J, Dobbs L, Hawgood S (1999) Ultrastructure of phospholipid mixtures reconstituted with surfactant proteins B and D. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 1049-58
- Poulain FR, Allen L, Williams MC, Hamilton RL, Hawgood S (1992) Effects of surfactant apolipoproteins on liposome structure: implications for tubular myelin formation. *Am J Physiol* 262: L730-9
- Poulain FR, Nir S, Hawgood S (1996) Kinetics of phospholipid membrane fusion induced by surfactant apoproteins A and B. *Biochim Biophys Acta* 1278: 169-75
- Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV (1999) In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet* 26: 1-3
- Raj JU, Bland RD (1986) Lung luminal liquid clearance in newborn lambs. Effect of pulmonary microvascular pressure elevation. *Am Rev Respir Dis* 134: 305-10
- Rawlings JS, Smith FR (1984) Transient tachypnea of the newborn. An analysis of neonatal and obstetric risk factors. *Am J Dis Child* 138: 869-71
- Rooney SA, Gobran LI, Wai-Lee TS (1977) Stimulation of surfactant production by oxytocin-induced labor in the rabbit. *J Clin Invest* 60: 754-9

Rooney SA, Young SL, Mendelson CR (1994) Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J* 8: 957-67

Rubaltelli FF, Bonafe L, Tangucci M, Spagnolo A, Dani C (1998a) Epidemiology of neonatal acute respiratory disorders. A multicenter study on incidence and fatality rates of neonatal acute respiratory disorders according to gestational age, maternal age, pregnancy complications and type of delivery. Italian Group of Neonatal Pneumology. *Biol Neonate* 74: 7-15

Rubaltelli FF, Dani C, Reali MF, Bertini G, Wiechmann L, Tangucci M, Spagnolo A (1998b) Acute neonatal respiratory distress in Italy: a one-year prospective study. Italian Group of Neonatal Pneumology. *Acta Paediatr* 87: 1261-8

Sandberg K, Sjoqvist BA, Hjalmarson O, Olsson T (1987) Lung function in newborn infants with tachypnea of unknown cause. *Pediatr Res* 22: 581-6

Sano H, Sohma H, Muta T, Nomura S, Voelker DR, Kuroki Y (1999) Pulmonary surfactant protein A modulates the cellular response to smooth and rough lipopolysaccharides by interaction with CD14. *J Immunol* 163: 387-95

Schatz M (1999) Asthma and pregnancy. *Lancet* 353: 1202-4

Schatz M, Zeiger RS, Hoffman CP, Saunders BS, Harden KM, Forsythe AB (1991) Increased transient tachypnea of the newborn in infants of asthmatic mothers. *Am J Dis Child* 145: 156-8

Schurch S, Possmayer F, Cheng S, Cockshutt AM (1992) Pulmonary SP-A enhances adsorption and appears to induce surface sorting of lipid extract surfactant. *Am J Physiol* 263: L210-8

Shohat M, Levy G, Levy I, Schonfeld T, Merlob P (1989) Transient tachypnoea of the newborn and asthma. *Arch Dis Child* 64: 277-9

Skelton R, Jeffery H (1994) "Click test": rapid diagnosis of the respiratory distress syndrome. *Pediatr Pulmonol* 17: 383-9

Spillman T, Cotton DB, Golunski E (1988) Detection frequency by thin-layer chromatography of phosphatidylglycerol in amniotic fluid with clinically functional pulmonary surfactant. *Clin Chem* 34: 1976-82

Stahlman MT (1977) Respiratory disorders in the newborn: type II respiratory distress. *Kendig E.L. (ed) Disorders of the Respiratory Tract in Children, Philadelphia: W.B. Saunders* 290-292

Stastny B, Kind C (1998) Acute pulmonary oedema due to transient myocardial dysfunction: an uncommon cause of respiratory distress in the term neonate. *Eur J Pediatr* 157: 59-62

Strayer M, Savani RC, Gonzales LW, Zaman A, Cui Z, Veszelovszky E, Wood E, Ho YS, Ballard PL (2002) Human surfactant protein B promoter in transgenic mice: temporal, spatial, and stimulus-responsive regulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L394-404

Sundell HW, Brigham KL, Harris TR, Lindstrom DP, Catterton WZ, Green R, Rojas J, Stahlman MT (1980) Lung water and vascular permeability-surface area in newborn lambs delivered by Caesarean section compared with the 3-5 days-old lamb and adult sheep. *J Dev Physiol* 2: 191-204

Swezey N, Tchepichev S, Gagnon S, Fertuck K, O'Brodovich H (1998) Female gender hormones regulate mRNA levels and function of the rat lung epithelial Na channel. *Am J Physiol* 274: C379-86

Taylor PM (1971) Respiratory distress in the newborn. *Clin Obstet Gynecol* 14: 763-89

Tokieda K, Ikegami M, Wert SE, Baatz JE, Zou Y, Whitsett JA (1999) Surfactant protein B corrects oxygen-induced pulmonary dysfunction in heterozygous surfactant protein B-deficient mice. *Pediatr Res* 46: 708-14

Tokieda K, Whitsett JA, Clark JC, Weaver TE, Ikeda K, McConnell KB, Jobe AH, Ikegami M, Iwamoto HS (1997) Pulmonary dysfunction in neonatal SP-B-deficient mice. *Am J Physiol* 273: L875-82

- Torday JS, Nielsen HC, Fencel Mde M, Avery ME (1981) Sex differences in fetal lung maturation. *Am Rev Respir Dis* 123: 205-8
- Tredano M, Griesse M, de Blic J, Lorant T, Houdayer C, Schumacher S, Cartault F, Capron F, Boccon-Gibod L, Lacaze-Masmonteil T, Renolleau S, Delaisi B, Elion J, Couderc R, Bahuaud M (2003) Analysis of 40 sporadic or familial neonatal and pediatric cases with severe unexplained respiratory distress: relationship to SFTPB. *Am J Med Genet A* 119: 324-39
- Tudehope DI, Smyth MH (1979) Is "transient tachypnoea of the newborn" always a benign disease? Report of 6 babies requiring mechanical ventilation. *Aust Paediatr J* 15: 160-5
- van Iwaarden F, Welmers B, Verhoef J, Haagsman HP, van Golde LM (1990) Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defense mechanism of rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2: 91-8
- van Iwaarden JF, Claassen E, Jeurissen SH, Haagsman HP, Kraal G (2001) Alveolar macrophages, surfactant lipids, and surfactant protein B regulate the induction of immune responses via the airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 452-8
- Vandenbussche G, Clercx A, Clercx M, Curstedt T, Johansson J, Jornvall H, Ruysschaert JM (1992) Secondary structure and orientation of the surfactant protein SP-B in a lipid environment. A Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochemistry* 31: 9169-76
- Veldhuizen EJ, Batenburg JJ, van Golde LM, Haagsman HP (2000) The role of surfactant proteins in DPPC enrichment of surface films. *Biophys J* 79: 3164-71
- Veldhuizen EJ, Haagsman HP (2000) Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1467: 255-70
- Veletza SV, Rogan PK, TenHave T, Olowe SA, Floros J (1996) Racial differences in allelic distribution at the human pulmonary surfactant protein B gene locus (SP-B). *Exp Lung Res* 22: 489-94
- von Neegaard K (1929) Neue Auffassungen über einen Grund-begriff der Atemmechanik. *Z Gesamte Exp Med* 66: 373-394
- Voorhout WF, Veenendaal T, Haagsman HP, Verkleij AJ, van Golde LM, Geuze HJ (1991) Surfactant protein A is localized at the corners of the pulmonary tubular myelin lattice. *J Histochem Cytochem* 39: 1331-6
- Voorhout WF, Veenendaal T, Haagsman HP, Weaver TE, Whitsett JA, van Golde LM, Geuze HJ (1992) Intracellular processing of pulmonary surfactant protein B in an endosomal/lysosomal compartment. *Am J Physiol* 263: L479-86
- Voorhout WF, Weaver TE, Haagsman HP, Geuze HJ, Van Golde LM (1993) Biosynthetic routing of pulmonary surfactant proteins in alveolar type II cells. *Microsc Res Tech* 26: 366-73
- Vorbroker DK, Profitt SA, Noguee LM, Whitsett JA (1995) Aberrant processing of surfactant protein C in hereditary SP-B deficiency. *Am J Physiol* 268: L647-56
- Voss T, Eistetter H, Schafer KP, Engel J (1988) Macromolecular organization of natural and recombinant lung surfactant protein SP 28-36. Structural homology with the complement factor C1q. *J Mol Biol* 201: 219-27
- Walters DV, Olver RE (1978) The role of catecholamines in lung liquid absorption at birth. *Pediatr Res* 12: 239-42
- Weaver TE, Conkright JJ (2001) Function of surfactant proteins B and C. *Annu Rev Physiol* 63: 555-78
- Wesenberg RL, Graven SN, McCabe EB (1971) Radiological findings in wet-lung disease. *Radiology* 98: 69-74
- Whitsett JA, Noguee LM, Weaver TE, Horowitz AD (1995) Human surfactant protein B: structure, function, regulation, and genetic disease. *Physiol Rev* 75: 749-57

- Whitsett JA, Weaver TE (2002) Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med* 347: 2141-8
- Williams GD, Christodoulou J, Stack J, Symons P, Wert SE, Murrell MJ, Nogue LM (1999) Surfactant protein B deficiency: clinical, histological and molecular evaluation. *J Paediatr Child Health* 35: 214-20
- Williams MC, Hawgood S, Hamilton RL (1991) Changes in lipid structure produced by surfactant proteins SP-A, SP-B, and SP-C. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5: 41-50
- Wiswell TE, Bent RC (1993) Meconium staining and the meconium aspiration syndrome. Unresolved issues. *Pediatr Clin North Am* 40: 955-81
- Wiswell TE, Rawlings JS, Smith FR, Goo ED (1985) Effect of furosemide on the clinical course of transient tachypnea of the newborn. *Pediatrics* 75: 908-10
- Yusen RD, Cohen AH, Hamvas A (1999) Normal lung function in subjects heterozygous for surfactant protein-B deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 411-4



## 7. ANHANG

### 7.1 Häufig verwendete Abkürzungen

ARDS	akutes Lungenversagen
bp	Basenpaar
CAP	kongenitale Alveolarproteinose
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddNTPs	Didesoxy-Nukleotid-Triphosphat
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosin-Triphosphat
dGTP	Desoxy-Guanin-Triphosphat
dTTP	Desoxy-Thyrosin-Triphosphat
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
ENaC	epitheliale Natriumkanäle
FG	Frühgeborenes
FLA	Fragmentlängenanalyse
IUGR	intrauterine Wachstumsretardierung
LB	Lamellarkörperchen
LPS	Lipopolysaccharid
MVB	multivesicular bodies
NG	Neugeborenes
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RDS	Atemnotsyndrom des Frühgeborenen
SD	Standardabweichung
SP	Surfactant-assoziiertes Protein
SP-A, -B, -C, -D	Surfactant-assoziiertes Protein A, B, C, D
SSW	Schwangerschaftswoche
TTN	transiente Tachypnoe des Neugeborenen
UV	Ultraviolett

## 7.2 Danksagung

An dieser Stelle gilt mein Dank allen, die in den letzten Jahren durch ihre Mitarbeit und Unterstützung zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Ludwig Gortner möchte ich besonders herzlich danke sagen, der mir dieses Projekt anvertraut hat und mir die Möglichkeit gab, meine Dissertation an seinem Institut anfertigen zu können. Er hat mich während der gesamten Arbeit stets hilfreich und motivierend begleitet.

Vergessen möchte ich nicht die große Hilfe, die nette und produktive Zusammenarbeit der Kollegen und aller Mitarbeiter aus dem Labor und der Klinik. Insbesondere an Vanessa und Birgit, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, geht mein Dank.

Vielen Dank auch meinen Freunden für den Mut, die Unterstützung und die Ablenkung, die sie mir gegeben haben. Mein tiefster Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie, die mich bis an ihre Grenzen unterstützt und gefördert haben. Diese Arbeit ist nicht minder ihr Verdienst.

## 7.4 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Erol Tutdibi
Geburtsdatum und -ort	18. Mai 1973 in Kempten
Anschrift	Hölderlinstraße 9, 35415 Pohlheim
Eltern	Mehmet und Gülhayir Tutdibi

### Schulbildung

1979 - 1983	Grundschule an der Sutt (Kempten)
1983 - 1984	Robert-Schumann-Hauptschule (Kempten)
1984 - 1993	Hildegardis Gymnasium (Kempten)
Juli 1993	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Studium

1993 - 2000	Studium der Humanmedizin Medizinische Fakultät der Universität Ulm
	Praktisches Jahr 1999/2000: Innere Medizin: Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Ulm Chirurgie: Ga-Rankuwa Hospital, Medical University of Southern Africa, Pretoria, Südafrika Pädiatrie: Health Science Center at Brooklyn, State University of New York, USA

### Stipendium

November 1997	Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes
---------------	--

### Wissenschaftliche Arbeit

2000 - 2003	Experimentelle Arbeit im Gen-Forschungslabor der Abt. Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie, Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der JLU-Giessen
-------------	--

### Veröffentlichungen

2003	Transient tachypnea of the newborn (TTN) : A role for polymorphisms of Surfactant Protein B (SP-B) encoding gene?, Klinische Pädiatrie 215:248-251
------	--

### Tätigkeit als Arzt

Oktober 2000 - April 2005	Arzt im Praktikum und Assistenzarzt im Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Abt. Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie der JLU-Giessen
seit Mai 2005	Assistenzarzt im Klinik für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie der Kliniken für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes Homburg-Saar

### 7.3 Datenerhebungsbogen

Zur Erhebung der mütterlichen und neonatalen Daten in der Arbeit wurde der folgende Bogen verwendet.

1

#### Transient tachypnea of the newborn and SP- B and ENaC study

- Cooperative Project of the Children's University Hospital Giessen -

<b>samples</b>
blood samples (in EDTA or heparin) or cell pellets
1- 2 ml
stored at -20°C
<b>patients</b>
<b>term newborn: GA <math>\geq</math> 37 weeks</b>
<b>transient tachypnea <sup>a)</sup></b>

please mark where applicable

<b>exclusion criterias</b>			
▪ infections: i.e. pneumonia, sepsis <sup>b)</sup> , clinical sepsis <sup>c)</sup> .....	<input type="checkbox"/>	no	
▪ structural pulmonary or cardiac anomalies .....	<input type="checkbox"/>	no	
▪ underlying cardiac diseases .....	<input type="checkbox"/>	no	
▪ myokardial dysfunction <sup>d)</sup> .....	<input type="checkbox"/>	no	
▪ onset of respiratory symptoms > 24h postnatal .....	<input type="checkbox"/>	no	
▪ postnatal asphyxia <sup>e)</sup> .....	<input type="checkbox"/>	no	
▪ infant of diabetic mother .....	<input type="checkbox"/>	no	
▪ meconium aspiration syndrom <sup>f)</sup> .....	<input type="checkbox"/>	no	
<b>maternal diseases</b>			
▪ asthma:	<input type="checkbox"/>	no	<input type="checkbox"/> yes
▪ diabetes:	<input type="checkbox"/>	no	<input type="checkbox"/> yes
▪ preeclampsia <sup>g)</sup>	<input type="checkbox"/>	no	<input type="checkbox"/> yes
▪ smoking during pregnancy	<input type="checkbox"/>	no	<input type="checkbox"/> yes
▪ thyroid dysfunction	<input type="checkbox"/>	no	<input type="checkbox"/> yes $\Rightarrow$ <input type="checkbox"/> hyperthyroidism <input type="checkbox"/> hypothyroidism

**antenatal data**

- glucocorticoid therapy ☐ no ☐ yes
- tokolytics ( $\beta$ -mimetics) ☐ no ☐ yes
- preterm rupture of membranes <sup>h)</sup> ☐ no ☐ yes

**peripartal data**

- mode of delivery ☐ vaginal ☐ cesarean section

**neonatal data**

- name of the newborn: .....
- gestational age <sup>i)</sup> .....weeks
- date of birth: .....
- sex: ☐ male ☐ female
- birth weight: ..... gram
- birth length: ..... cm
- APGAR at 1 minute ..... at 5 minutes .....
- umbilical artery pH: .....
- consanguinity: ☐ no ☐ yes  $\Rightarrow$  typ .....
- siblings with same/similar neonatal history ☐ no ☐ yes  $\Rightarrow$  .....
- multiple gestation: ☐ no ☐ twins ☐ triplets ☐ other .....  
which of the newborns ? ☐ 1. ☐ 2. ☐ 3. ☐ .....

**clinical diagnosis**

- intracranial hemorrhage <sup>j)</sup> ☐ no ☐ yes ( grading 1-4: ..... )
- notes about additional diagnosis and therapy :

.....  
 .....  
 .....  
 .....

**medication**

- catecholamines ☐ no ☐ yes
- steroids postnatal ☐ no ☐ yes (duration of therapy: ..... dose: ..... )
- antibiotics ☐ no ☐ yes (drug:.....duration: ..... dose: ..... )

**clinical course**

- |                                    |                             |                              |                    |
|------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------|
| ▪ mechanical ventilation           | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> yes | (duration: ..... ) |
| ▪ CPAP                             | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> yes | (duration: ..... ) |
| ▪ oxygen supplement                | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> yes | (duration: ..... ) |
| ▪ pulmonary interstitial emphysema | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> yes |                    |
| ▪ pneumothorax                     | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> yes |                    |
| ▪ death $\leq$ 28days postnatal    | <input type="checkbox"/> no | <input type="checkbox"/> yes |                    |

**thank you very much for your cooperation**

.....  
(date and place)

.....  
(name and sign of physician)

**for any question please don't hesitate to contact us:**

Prof. GORTNER (Chief of Department)  
 Erol TUTDiBi (physician): [erol.tutdibi@paediat.med.uni-giessen.de](mailto:erol.tutdibi@paediat.med.uni-giessen.de)  
 Dr. Eva LANDMANN (physician)  
 Children's University Hospital Giessen, Feulgenstr.12, 35392 Giessen, Germany  
 Tel: 0049-641-9943473 Fax: 0049-641-9943479

definitions:

---

- tachypnea  $> 60$  breaths/min,  $FiO_2 > 0.21$ , diagnosis is based on radiologic criterias
- based on clinical signs, positive culture, blood count and differential, increased CrP  $< 24$ h postnatal
- based on clinical signs without increased CrP and positive culture
- echocardiographic diagnosis, absence of heart defects
- apgar score  $\leq 6$  at 5 minutes or umbilical artery pH  $< 7.10$
- typical chest x-ray findings, severe respiratory distress, presence of meconium in amniotic fluid and in airways
- proteinuria and hypertension during pregnancy
- spontaneous rupture of membranes  $\geq 12$ h antepartal
- based on maternal menstrual history or early prenatal ultrasound
- ultrasound, Papile's et al. classification